

SÉRIE A, N° 320

N° D'ORDRE :

344

THÈSES

PRÉSENTÉES

A LA FACULTÉ DES SCIENCES
DE L'UNIVERSITÉ DE PARIS

POUR OBTENIR

LE TITRE DE DOCTEUR DE L'UNIVERSITÉ

PAR

M. EKREM-RESIT

Chimiste diplômé de l'Université turque d'Istanbul

1^{re} THÈSE. — CONTRIBUTION A L'ÉTUDE
DE LA FERMENTATION MANNITIQUE

2^e THÈSE. — PROPOSITIONS DONNÉES PAR LA FACULTÉ.

Soutenues le

devant la Commission d'examen :

MM. G. BERTRAND, *Président*

R. COMBES }
E. AUBEL } *Examineurs*

23 AVRIL 1936

Imprimerie Alençonnaise
9-13, rue des Marcheries
ALENÇON

SÉRIE A, N° 320

N° D'ORDRE :

344

THÈSES

PRÉSENTÉES

A LA FACULTÉ DES SCIENCES
DE L'UNIVERSITÉ DE PARIS

POUR OBTENIR

LE TITRE DE DOCTEUR DE L'UNIVERSITÉ

PAR

M. EKREM-REŞİT

Chimiste diplômé de l'Université turque d'Istanbul

1^{re} THÈSE. — CONTRIBUTION A L'ÉTUDE
DE LA FERMENTATION MANNITIQUE

2^e THÈSE. — PROPOSITIONS DONNÉES PAR LA FACULTÉ.

Soutenues le

devant la Commission d'examen :

MM. G. BERTRAND, *Président*

R. COMBES } *Examineurs*
E. AUBEL }

Imprimerie Alençonnaise
9-13, rue des Marcheries
ALENÇON

FACULTÉ DES SCIENCES DE L'UNIVERSITÉ DE PARIS

MM.

Doyen honoraire. . . . M. MOLLIARD.

Doyen. C. MAURAIN, *Professeur*, Physique du Globe.

<i>Professeurs honoraires</i>	{	H. LE CHATELLIER.	Léon BRILLOUIN.	AUGER.
		H. LEBESGUE.	GOURSAT.	BLAISE.
		A. FERNBACH.	WALLERANT.	DANGEARD.
		A. LEDUC.	GUILLET.	JANET.
		Émile PICARD.	PÉCHARD.	LESPIEAU.
		Rémy PERRIER.	FREUNDLER.	MARCHIS.
				VESSIOT.

PROFESSEURS

G. BERTRAND . . .	T	Chimie biologique.	M. JAVILLIER . . .	Chimie biologique.
M. CAULLERY . . .	T	Zoologie (Évolution des êtres organisés).	L. JOLEAUD . . .	Paléontologie.
G. URBAIN	T	Chimie générale.	ROBERT-LÉVY . . .	Zoologie.
Émile BOREL . . .	T	Calcul des probabilités et Physique mathématique.	F. PICARD	Zoologie (Évolution des êtres organisés).
Jean PERRIN . . .	T	Chimie physique.	Henri VILLAT . . .	T Mécanique des fluides et applications.
H. ABRAHAM . . .	T	Physique.	Ch. JACOB	T Géologie.
E. CARTAN	T	Géométrie supérieure.	P. PASCAL	T Chimie minérale.
M. MOLLIARD . . .	T	Physiologie végétale.	M. FRÉCHET . . .	T Calcul différentiel et calcul intégral.
L. LAPICQUE . . .	T	Physiologie générale.	E. ESCLANGON . . .	T Astronomie.
A. COTTON	T	Recherches physiques.	M ^{me} RAMART-LUCAS	T Chimie organique.
J. DRACH	T	Analyse supérieure et Algèbre supérieure.	H. BÉGHIN	T Mécanique physique et expérimentale.
Charles FABRY . .	T	Enseignement de Physique.	Foch	Mécanique expérimentale des fluides.
Charles PÉREZ . .	T	Zoologie.	PAUTHENIER . . .	Physique (P. C. B.).
Léon BERTRAND .	T	Géologie structurale et Géologie appliquée.	De BROGLIE . . .	T Théories physiques.
P. PORTIER	T	Physiologie comparée.	CHRÉTIEN	Optique appliquée.
E. RABAUD	T	Biologie expérimentale.	P. JOB	Chimie générale.
M. GUICHARD . . .		Chimie minérale.	LABROUSTE . . .	Physique du Globe.
Paul MONTEL . . .	T	Théorie des fonctions et Théorie des transformations.	PRENANT	Zoologie.
P. WINTREBERT .	T	Anatomie et Histologie comparées.	VILLEY	Mécanique physique et expérimentale.
L. BLARINGHEM .	T	Botanique.	BOHN	Zoologie (P. C. B.).
O. DUBOSQ	T	Biologie maritime.	COMBES	Botanique (P. C. B.).
G. JULIA	T	Mécanique analytique et Mécanique céleste.	GARNIER	T Mathématiques générales
C. MAUGUIN . . .	T	Minéralogie.	PÈRES	Mécanique des fluides.
A. MICHEL-LÉVY .	T	Pétrographie.	HACKSPILL	Chimie (P. C. B.).
H. BÉNARD	T	Mécanique expérimentale des fluides.	LAUGIER	Physiologie générale.
A. DENJOY	T	Application de l'analyse à la Géométrie.	TOUSSAINT	Technique Aéronautique
L. LUTAUD	T	Géographie physique et Géologie dynamique.	M. CURIE	Physique (P. C. B.).
Eugène BLOCH . .	T	Physique théorique et Physique céleste.	G. RIBAUD	T Hautes températures.
G. BRUHAT		Physique.	CHAZY	T Mécanique rationnelle.
E. DARMOIS . . .		Enseignement de Physique.	GAULT	Chimie (P. C. B.).
A. DEBIERNE . . .	T	Radioactivité.	CROZE	Recherches physiques.
A. DUFOUR	T	Physique (P. C. B.).	DUPONT	T Théories chimiques.
L. DUNOYER . . .		Optique appliquée.	LANQUINE	Géologie.
A. GUILLIERMOND	T	Botanique.	VALIRON	Mathématiques générales
			BARRABÉ	Géologie structurale et Géologie appliquée.
			MILLOT	Zoologie (P. C. B.).
			F. PERRIN	Théories physiques.
			VAVON	Chimie organique.

Secrétaire A. PACAUD.

Secrétaire honoraire. D. TOMBECK.



A MONSIEUR LE DOCTEUR LOUIS MARTIN

Directeur de l'Institut Pasteur
Membre de l'Académie de Médecine

*Hommage très respectueux de
reconnaissance.*



A LA MÉMOIRE DE MON REGRETTÉ MAÎTRE

MONSIEUR MICHEL FAILLEBIN

Ancien Maître de Conférences à l'Université de Strasbourg
Ancien Professeur de Chimie Physique
à l'Université Turque d'Istanbul

*Qui m'a initié à la science
chimique et m'a guidé vers l'Ins-
titut Pasteur.*

A MONSIEUR GABRIEL BERTRAND

Professeur à la Faculté des Sciences
Chef de Service à l'Institut Pasteur
Membre de l'Institut, de l'Académie de Médecine
et de l'Académie d'Agriculture

*Témoignage de ma profonde
gratitude.*

A MONSIEUR M. SCHOEN

Professeur à l'Institut Pasteur
Chef du Service des Fermentations

*Chez qui j'ai trouvé la plus
bienveillante hospitalité et une
affection paternelle durant mes
études à l'Institut Pasteur.*

*Je lui dois toute ma formation
dans la biochimie, la microbio-
logie et la science des fermenta-
tions, et mon évolution intellec-
tuelle en général.*

*C'est lui seul qui m'a guidé pas
à pas dans ce travail.*

*Qu'il soit assuré de mon dé-
vouement respectueux.*

A MESSIEURS P. BERAUD ET P. BRÉCHOT

Assistants à l'Institut Pasteur

*Qui m'ont accueilli en cama-
rade et m'ont grandement aidé
dans mon travail.*

I. — PREMIÈRE PARTIE

1^o LA FERMENTATION MANNITIQUE DANS LES MALADIES DU VIN

Avant la période pasteurienne, on ignorait complètement la cause des maladies qui rendaient la bière et le vin très souvent impropres à la consommation.

En effet, le vin, comme tous les liquides organiques, est de nature à donner asile à des ferments divers capables d'agir sur les différents constituants de cette boisson et de dénaturer complètement le produit.

Parmi les divers micro-organismes qui engendrent les maladies du vin, l'on rencontre aussi bien des aérobiees que des anaérobies. Les maladies dues aux micro-organismes aérobiees sont : la maladie de la fleur, causée par le *mycoderma vini*, et la maladie de l'aigre, provoquée par le *mycoderma aceti*.

Les maladies dues aux micro-organismes anaérobies sont, entre autres, la maladie de la tourne, due au ferment de la tourne et la maladie de l'amertume, causée par le ferment de l'amer ; la maladie de la graisse, due au *Bacillus viscosus* ; la fermentation lactique et enfin la fermentation mannitique, provoquée par le ferment mannitique.

Dans ce travail, c'est cette dernière fermentation qui fera l'objet des études, d'une part, au point de vue de son mécanisme chimique et, d'autre part, au point de vue de la spécificité biologique de son agent.

Les vins dits mannités ont un goût aigre-doux,

goût dû à la présence de mannitol et de quantités plus ou moins élevées d'acides lactique et acétique. Ce sont ces constituants qui permettent l'identification de ces vins malades.

Cette maladie sévit surtout dans les pays chauds ; elle est caractérisée par la présence constante des produits qui viennent d'être indiqués.

La présence de mannitol dans les vins, surtout dans les vins d'Algérie, a été signalée dès 1891 par Kramer (1). La même année, M. P. Carle (2) a attribué la présence anormale de mannitol à un frauduleux coupage de ces vins avec le vin de figues. L'année suivante, Portes (3), en ensemençant le vin tourné dans le jus de chasselas de Paris et dans un bouillon qui contenait du sucre interverti, constata que la présence de sucre interverti était nécessaire pour que le mannitol puisse prendre naissance dans une fermentation provoquée par une semence provenant d'un vin mannité. Blarez (4) a vu que même les vins de Bordeaux peuvent contenir du mannitol.

Enfin, en 1893, Roos (5) a constaté que la présence du mannitol dans le vin ne provenait pas d'une frauduleuse introduction de vin de figues, comme l'a suggéré Carle, mais que la présence de ce polyalcool était due à l'action d'un micro-organisme, qui se développe au cours même de la fermentation du moût de raisin. Roos a isolé ce micro-organisme et l'a cultivé dans un milieu glucosé. Mais, fait intéressant,

(1) E. KRAMER : La maladie visqueuse du vin. *Journal de pharmacie et de chimie*, t. 23, 1891, p. 127.

(2) P. CARLE : Sur la caractéristique des vins de figue. *Journal de pharmacie et de chimie*, t. 23, 1891, p. 537.

(3) PORTES : *Journal de pharmacie et de chimie*, t. 26, 1892, p. 382.

(4) BLAREZ : Note sur les vins mannités. *Journal de pharmacie et de chimie*, t. 27, 1893, p. 260.

(5) ROOS : La fermentation mannitique des vins. *Journal de pharmacie et de chimie*, t. 27, 1893, p. 405.

il n'a pas pu trouver du mannitol parmi les produits de la fermentation, et pour cause, comme on le verra tout à l'heure. Laborde (6), en étudiant ce même problème, a pu constater que les ferments mannitiques se trouvaient dans le vin, sans que celui-ci contienne nécessairement du mannitol, et cet auteur attribue ce fait à l'attaque par le ferment mannitique de son propre produit, c'est-à-dire le mannitol.

Il est digne de remarque que, si la maladie mannitique et, par conséquent, la présence de mannitol dans le vin malade n'a été aperçue que vers la fin du XIX^e siècle, la présence du mannitol parmi les produits de la fermentation fut connue bien avant.

En effet, le mannitol fut découvert, en 1806, par Proust (7), qui l'a extrait de la manne par l'esprit-de-vin, c'est-à-dire l'alcool. Deux ans plus tard, en 1808, Fourcroy et Vauquelin (8) ont remarqué, pour la première fois, la production du mannitol dans une fermentation. Ces auteurs, en cherchant la cause de la différence de composition que montrent diverses sortes de liliacées, ont fait fermenter le suc de leurs oignons et ont constaté la présence de mannitol parmi les produits de la fermentation.

Braconnot (9), en 1813, en étudiant la fermentation de son acide nancéique, qui n'est autre chose que l'acide lactique, a trouvé du mannitol dans le jus de betteraves soumis à la fermentation. Guibourt (10),

(6) LABORDE : Sur les ferments des maladies des vins. *Comptes rendus de l'Académie des Sciences*, t. 126, 1898, p. 1223.

(7) PROUST : Sur le sucre de raisin. *Annales de chimie* [1^{re} série] t. 56, 1806, p. 131.

(8) FOURCROY et VAUQUELIN : Sur l'analyse chimique, de l'oignon. *Annales de chimie*, [1^{re} série] t. 65, 1808, p. 161.

(9) BRACONNOT : Sur un acide particulier qui se développe dans les matières acescentes. *Annales de chimie*, [1^{re} série] t. 86, 1813, p. 84.

(10) GUIBOURT : Observations sur le miel. *Annales de chimie et de physique*, [2^e série] t. 16, 1821, p. 371.

en 1821, a signalé la présence de mannitol dans le miel fermenté. Gay-Lussac et Pelouze (11), enfin, trouvent ce polyalcool dans une fermentation lactique ; ce fait, du reste, a été signalé, par la suite, par divers auteurs.

Ainsi Liebig et Pelouze (12), en 1836, ont trouvé le mannitol dans une fermentation lactique et ont indiqué, pour la première fois, le poids moléculaire de ce polyalcool.

Boutron et Fremy (13), dans une étude fort détaillée sur la production de l'acide lactique dans les fermentations, remarquèrent qu'on obtenait quelquefois de l'acide lactique pur, mais que quelquefois cet acide était accompagné d'une quantité considérable de mannitol.

En 1855, A. Strecker (14) souligne la présence du mannitol dans une fermentation propionique s'effectuant dans une solution de glucose à la suite d'une addition de lait aigre ou de fromage.

La même année, Marcellin Berthelot (15) a extrait du mannitol en évaporant huit litres de cidre.

Que cette production du mannitol, au cours de la fermentation lactique, n'ait pas échappé à Pasteur, on le comprendra facilement. En effet, dans son article publié en 1857 et intitulé ; *Mémoire sur la fermentation appelée lactique* (16), Pasteur expose la production du mannitol en ces termes :

(11) GAY-LUSSAC et PELOUZE : Sur l'acide lactique. *Annales de chimie et de physique*, [2^e série] t. 52, 1833, p. 410.

(12) LIEBIG et PELOUZE : La mannite. *Annales de chimie et de physique*, [2^e série] t. 63, 1836, p. 138.

(13) BOUTRON et FREMY : Recherches sur la fermentation lactique. *Annales de chimie et de physique*, [3^e série] t. 2, 1841, p. 257.

(14) STRECKER : Sur un mode de formation particulière de l'acide propionique. *Annales de chimie et de physique*, [3^e série] t. 43, 1855, p. 340.

(15) M. BERTHELOT : Sur quelques matières sucrées. *Annales de chimie et de physique*, [3^e série] t. 46, 1855, p. 83.

(16) L. PASTEUR : Mémoire sur la fermentation appelée lactique. *Comptes rendus de l'Académie des Sciences*, t. 45, 1857, p. 913. Voir aussi *Œuvres de Pasteur*, réunies par Pasteur Vallery-Radot, t. 2, p. 16.

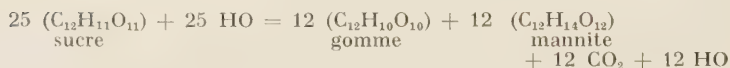
« La fermentation lactique est donc, aussi bien que la fermentation alcoolique ordinaire, un acte corrélatif de la production d'une matière azotée, qui a toutes les allures d'un corps organisé mycodermique, probablement très voisin de la levure de bière. Mais les difficultés du sujet ne sont qu'à moitié résolues. Sa complication est extrême. L'acide lactique est bien le produit principal de la fermentation à laquelle il a donné son nom. Il est loin d'être seul, on le trouve constamment accompagné d'acide butyrique, d'alcool, de mannite, de matière visqueuse. Les proportions de ces matières sont soumises aux plus capricieuses variations. Il y a une circonstance mystérieuse relative à la mannite. Non seulement la proportion qui s'en forme est sujette aux plus grandes variations. M. Berthelot vient d'établir, en outre, que si l'on remplace le sucre par la mannite dans la fermentation lactique, toutes les autres conditions demeurant sensiblement les mêmes, la mannite fermente en donnant de l'alcool, de l'acide lactique et de l'acide butyrique. Comment, dès lors, concevoir qu'il puisse y avoir la formation de mannite dans des cas de fermentation lactique, puisque, peut-on croire, elle devrait se détruire au fur et à mesure de sa production.

« Etudions avec plus de soins que nous ne l'avons fait les propriétés chimiques de la nouvelle levure. J'ai dit que, lavée à grande eau et placée dans de l'eau sucrée pure, elle acidifiait progressivement la liqueur. La transformation du sucre devient, dans ces conditions, de plus en plus pénible à mesure que le liquide prend lui-même une plus grande acidité. Or, si on analyse la liqueur, ce qui ne peut être accompli avec succès qu'après la saturation des acides par la craie et la destruction ultérieure du sucre en excès par la levure de bière, on trouve dans le liquide éva-

poré, en proportion variable, de la mannite d'une part et, de l'autre, une matière visqueuse. »

Par ailleurs, en 1861, Pasteur, signale qu'il « est parvenu à isoler le ferment végétal produisant la fermentation visqueuse. Ce ferment végétal est constitué par des petits globules réunis en chapelet. Le diamètre de ces globules varie de 0 mm. 0012 à 0 mm. 0014, Lorsqu'on les sème dans un liquide sucré et contenant de l'albumine en dissolution, on obtient toujours la fermentation visqueuse. 100 gr. de sucre fournissent approximativement 51 gr. 09 de mannite et 45 gr. 5 de gomme; de plus, il se dégage de l'acide carbonique.

On a approximativement l'équation :



ce qui correspond, pour 100 gr. de sucre à :

mannite	59,09
gomme	45,98
acide carbonique	6,18

« Ce sont là des rapports sensiblement les mêmes que ceux constatés par l'expérience lorsqu'on opère exclusivement avec le ferment constitué par des petits globules en chapelet. Lorsque les proportions de gomme sont supérieures à celles de la mannite, on s'aperçoit qu'il y a dans le liquide de plus gros globules et d'une nature différente. Il serait possible que ce second ferment transformât le sucre en gomme seulement, sans qu'il y eût alors formation de la mannite. M. Pasteur n'a pas réussi encore à isoler ce second ferment du premier, qui toujours s'accompagne de la formation de la mannite.

« Le liquide le plus fréquemment apte à produire la fermentation visqueuse peut produire la fermentation lactique ou butyrique. Mais, dans ce cas, les êtres

organisés qui se développent dans le liquide sont de nature différente.

« L'auteur s'est assuré que la fermentation visqueuse, lactique ou butyrique, etc... est toujours coexistante avec le développement d'êtres organisés (17). »

2^o L'ISOLEMENT DU FERMENT MANNITIQUE
PAR GAYON ET DUBOURG, ET TRAVAUX ULTÉRIEURS

Le mérite d'avoir isolé le ferment mannitique, par conséquent, d'avoir résolu le problème que posaient les différentes fermentations, visqueuses, lactique et butyrique, et d'avoir trouvé enfin la cause de la maladie mannitique des vins, appartient à un des premiers disciples de Pasteur, U. Gayon, et à son collaborateur Dubourg (18).

Gayon et Dubourg montrèrent, tout d'abord, que les quantités de mannitol qu'on trouve dans des vins varient dans des limites très larges : de 1 gr. à 30 gr. par litre. Ce sont les vins blancs qui sont beaucoup plus rarement mannités que les vins rouges. Les mêmes auteurs constatèrent, en outre, que les vins mannités renferment généralement un excès de sucre et que leurs extraits secs sont très élevés.

En 1894, Gayon et Dubourg isolent d'un vin d'Algérie le ferment mannitique à l'état pur. Dans leur premier mémoire, ils font voir que le ferment se développe avec plus d'aisance en présence de sucre interverti qu'en présence de glucose pur et que le fructose

(17) L. PASTEUR : Sur la fermentation visqueuse et butyrique. *Bulletin de la Soc. Chimique*, 1861-1862, p. 30.

(18) U. GAYON et E. DUBOURG : Sur les vins mannités. *Annales de l'Institut Pasteur*, t. 8, 1894, p. 108.

est attaqué plus rapidement que le glucose. Ils ont ensemencé ce microbe dans un milieu contenant de l'inuline hydrolysée et ont remarqué, d'une part, que la fermentation était beaucoup plus rapide en présence de fructose seul et, d'autre part, que l'augmentation de l'acidité gênait l'action du ferment (19).

Les acides produits dans cette fermentation engendrée par le ferment mannitique sont l'acide lactique et l'acide acétique.

Le produit principal de la fermentation du fructose est le mannitol. En dix-neuf jours, des 49 gr. par litre de fructose disparu, 35 gr. se sont transformés en mannitol. L'acide formé par litre, exprimé en acide sulfurique, atteint 6,54 par litre.

Dans un autre travail tout à fait complet, publié en 1901 (20), Gayon et Dubourg ont étudié les propriétés biologiques du ferment mannitique qu'ils avaient extrait d'un vin.

Ainsi, d'après cette étude, la température optimale du ferment mannitique est de 35°, la température mortelle est de 60°.

Le fluorure de sodium, le salicylate de soude, le thymol peuvent être utilisés comme antiseptiques; à la dose de 1 gr. par litre, ces substances arrêtent tout développement du ferment.

L'acidité joue un rôle important dans le développement du ferment mannitique et la quantité de sucre transformé en mannitol est en raison inverse de l'acidité primitive du milieu.

Le ferment mannitique fait fermenter, d'après Gayon et Dubourg, les sucres suivants : fructose, sorbose, glucose, mannose, galactose, sucre inter-

(19) U. GAYON et E. DUBOURG : *Ibidem*.

(20) U. GAYON et E. DUBOURG : Nouvelles recherches sur le ferment mannitique. *Annales de l'Institut Pasteur*, t. 15, 1901, p. 527.

verti, saccharose, maltose, lactose, raffinose, xylose.

Le ferment mannitique gêne d'une façon appréciable l'action de la levure, mais lui-même n'est pas gêné dans son action par la présence de la levure.

Parmi les sucres fermentescibles par le ferment mannitique, le fructose est le seul qui donne naissance au mannitol. Dans cette fermentation, il se produit encore de l'acide lactique, de l'acide acétique, de l'acide succinique, de l'acide carbonique et du glycérol.

Le glucose fermente moins facilement que le fructose et les principaux produits de cette fermentation sont l'acide acétique et l'acide lactique et on trouve encore de faibles quantités d'alcool et d'acide carbonique.

Sur le sucre interverti, le ferment mannitique agit d'une façon élective. C'est la fraction de fructose qui fermente plus vite que la fraction de glucose et la fermentation de ce dernier peut être tout à fait arrêtée si la concentration en sucre interverti est très élevée. Dans cette fermentation, chacun de ces sucres se comporte comme s'il était seul, c'est-à-dire que le fructose fournit du mannitol et le glucose n'en fournit point.

Le galactose, le mannose et le sorbose fermentent sans donner naissance au mannitol.

Le saccharose, le maltose, le lactose fermentent avec une très grande difficulté et ne donnent pas lieu à la production de mannitol.

Parmi les pentoses, seul le xylose est sensible à l'action du ferment mannitique.

Tels sont les faits principaux qui se dégagent des observations de Gayon et Dubourg.

Plus tard, en 1903, Mazé et Perrier (21) et, en 1904,

(21) P. MAZÉ et A. PERRIER : Sur la production de la mannite par les ferments des maladies des vins. *Annales de l'Institut Pasteur*, t. 17, 1903, p. 587.

Mazé et Pacottet (22), ont isolé des ferments des vins malades et surtout des vins tournés qui donnaient naissance à la production de mannitol dans un milieu contenant du fructose.

Mazé et Perrier conclurent que le ferment de vins atteints de la tourne qu'ils avaient étudié avait les mêmes propriétés physiologiques que le ferment mannitique de Gayon et Dubourg. Cependant ce ferment ne produit ni acide succinique, ni glycérol, aux dépens du glucose et, contrairement à l'observation de Gayon et Dubourg, il produit de l'alcool au cours de la fermentation mannitique du fructose.

Quant au mécanisme biochimique de l'action du ferment mannitique, Mazé et Perrier sont d'avis que, si, en présence de fructose libre, il se forme du mannitol, ce produit résulte d'une décomposition de l'eau dont les éléments se fixent, d'une part, sur l'alcool pour donner de l'acide acétique et, d'autre part, sur le fructose qui se transforme en mannitol.

Gayon et Dubourg, après avoir répété les expériences faites par Mazé et Perrier, affirment à nouveau que, dans la fermentation mannitique du fructose, l'alcool ne prend pas naissance et que l'acide succinique et le glycérol se trouvent parmi les produits finaux dans la fermentation du glucose (23).

Le mannitol peut-il être attaqué par le ferment mannitique ? Cette question a fait l'objet d'une étude publiée en 1912 (24) par Dubourg.

Dans cette étude, Dubourg reprend un travail fait

(22) P. MAZÉ et P. PACOTTET : Recherches sur les ferments des maladies des vins. *Annales de l'Institut Pasteur*, t. 18, 1904, p. 245.

(23) U. GAYON et E. DUBOURG : Sur la fermentation mannitique. *Annales de l'Institut Pasteur*, t. 18, 1904, p. 385.

(24) E. DUBOURG : Recherches sur le ferment mannitique. *Annales de l'Institut Pasteur*, t. 26, 1912, p. 923.

par Laborde (25), dans lequel ce dernier auteur admet la disparition du mannitol sous l'action de ferment mannitique.

Dubourg ajoute du mannitol à un vin qui en est dépourvu et qui était pasteurisé préalablement et l'ensemence avec le ferment mannitique. Soit après vingt mois, soit après huit ans, il constate que le mannitol ne disparaît pas du milieu mais au contraire que sa quantité augmente.

Dans ce même travail, Dubourg montre que la vitalité du ferment mannitique est très supérieure à celle du ferment lactique ordinaire ; le développement de ce germe n'est favorisé que quand il y a élévation de température et une faible acidité du moût au moment de la vendange.

*
* *

Le vin n'est pas l'habitat unique du ferment mannitique. Ce ferment, on le trouve encore dans le chou (Nelson et Beck, 1918) (26), le sol et le fumier (Fred, Peterson et Davenport, 1919) (27).

En 1920, W. H. Peterson et E. B. Fred étudient l'action du ferment mannitique (28) (*lactobacillus pentoaceticus* n. sp.) sur le lévulose et sur l'acide malique. Ces auteurs montrent que ce ferment transforme le fructose en mannitol, en produisant en même temps de l'acide lactique et de l'acide acétique. Fait important, le mannitol formé disparaît à la suite de l'action

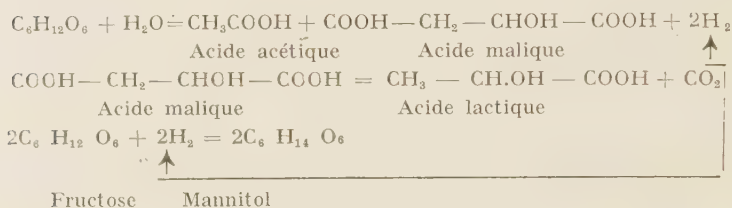
(25) LABORDE : Sur les ferments des maladies des vins. *Comptes rendus de l'Académie des Sciences*, t. 126, 1898, p. 1223.

(26) V. E. NELSON et A. J. BECK : Products of the fermentation of cabbage. *Journ., Amer. chemical Soc.*, t. 40, 1918, p. 1001.

(27) E. B. FRED, W. H. PETERSON et DAVENPORT : Acid fermentation of xylose. *Journ. biol.*, t. 39, 1919, p. 347.

(28) W. H. PETERSON et E. B. FRED : Fermentation of fructose by *lactobacillus pentoaceticus*, n. sp.. *Ibidem*, t. 41, 1920, p. 431.

du même ferment ; le ferment mannitique des auteurs américains agit sur l'acide malique employé à l'état de malate de sodium en le transformant en acide lactique et acide carbonique, accompagnés de faibles quantités d'acide acétique. Ces auteurs en déduisent que l'acide malique est le produit intermédiaire de la fermentation mannitique. Le mécanisme chimique de cette fermentation serait alors exprimé par la formule suivante :



Cependant, l'acide malique ne figure pas parmi les produits de la fermentation mannitique. Peterson et Fred en tirent la conclusion que la vitesse avec laquelle l'acide malique est formé est égale à la vitesse avec laquelle cet acide se transforme en acide lactique et CO_2 .

Dans un autre travail, publié la même année, Peterson et Fred (29) montrent que leur ferment, le *Lactobacillus pentoaceticus*, quoiqu'il ressemble en bien des points au ferment mannitique de Gayon et Dubourg, s'en différencie par le fait qu'il fait fermenter l'acide malique, le glycérol et le mannitol formés et ils étudient son action sur les aldoses.

Dans un autre travail, publié en 1925, Stiles, Peterson et Fred (30) isolent des ferments manni-

(29) W. H. PETERSON et E. B. FRED : The fermentation of glucose, galactose and mannose by *lactobacillus pentoaceticus*. Journ. biol. Chem., t. 42, 1920, p. 273.

(30) STILES, PETERSON et FRED : Mannitol forming bacteria fermentation. *Ibidem*, t. 64, 1925, p. 643.

tiques des céréales et étudient leur action sur les différents sucres.

Les quatre ferments qu'ils ont isolés transforment tous le fructose en mannitol ; cependant, ils se différencient les uns des autres par leurs manières de se comporter vis-à-vis d'autres sucres. Ainsi, l'un de ces ferments attaque le xylose et l'arabinose ; le deuxième détruit seulement l'arabinose, sans toucher au xylose ; le troisième fait fermenter seulement le xylose, sans toucher à l'arabinose et le quatrième n'agit sur aucun de ces sucres. Il faut noter que, seul, le troisième attaque le mannitol. Ce dernier microbe serait à rapprocher de celui qui a été étudié par Laborde.

Il s'ensuit qu'il existe différents ferments mannitiques et que, tout en transformant le fructose en mannitol, chacun peut agir d'une façon différente sur les autres sucres.

Signalons enfin les ferments divers isolés par Mezzadrolì. L'auteur italien désigne ces microbes sous des noms tels que : microbe lacto-invertisseur, acéto-invertisseur, etc., etc...

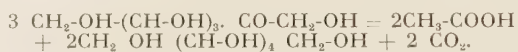
Parmi ces microbes figurent des ferments mannitiques qui seraient capables de produire cet alcool polyvalent aux dépens du saccharose, en même temps qu'ils produisent de l'alcool et de l'acide lactique. Ces microbes seraient des ferments puissants et leur emploi industriel a été préconisé (31).

V. Bolcato (32), enfin, admet qu'il existe une relation constante entre les quantités d'acide acétique et celles de mannitol résultant de la fermentation : ces quantités seraient entre elles dans le rapport de 1 à 3.

(31) G. MEZZADROLÌ : Les bacilles invertisseurs du saccharose et leur emploi dans la fabrication de l'acide lactique et de la mannite. *Annales de la Brasserie et de la Distillerie*, t. 25, 1926-1927, p. 153.

(32) V. BOLCATO : La fermentazione del levulosio. Suo possibilità schema. *Annali di chimica applicata*, t. 23, 1933, p. 405. 

En tenant compte de cette remarque et de quelques autres considérations, l'auteur établit un schéma de la fermentation mannitique où le méthylglyoxal et l'acide pyruvique jouent le rôle de corps intermédiaires ; d'après ce schéma, la fermentation mannitique se ramènerait à la formule globale suivante :



3^o LA FERMENTATION MANNITIQUE COMME SPÉCIFICITÉ BIOCHIMIQUE PARTICULIÈRE ET SA PLACE PARMI LES AUTRES TYPES DE FERMENTATION

Quel est le mécanisme intime de la fermentation mannitique ? Comment le ferment mannitique parvient-il à disloquer la molécule de fructose, à lui arracher deux atomes d'hydrogène et à transporter cet hydrogène sur une autre molécule de fructose qui donne ainsi naissance à la production de mannitol ? On voit que ce qui caractérise la fermentation mannitique, c'est que, ici, se manifeste d'une façon évidente l'action de l'hydrogène actif arraché à la molécule de sucre.

Ce qui frappe encore dans la fermentation mannitique, c'est la manifestation de la *spécificité mannitique*, laquelle ne se fait jour qu'en présence du fructose et qui semble être une propriété exclusive des ferments appelés mannitiques.

Que tous les micro-organismes possèdent une spécificité fonctionnelle, tout le monde en convient.

Ainsi, les levures sont considérées comme agents de la fermentation éthylique par excellence. Dans la fermentation éthylique provoquée par la levure, cette

spécificité s'affirme par la transformation du sucre en alcool éthylique et en CO_2 .

Les bactéries lactiques engendrent une fermentation dont le produit est l'acide lactique, et dans le cas de la fermentation butyrique, ce sont les bactéries butyriques qui sont responsables de la production de l'acide butyrique.

Il faut donc admettre que chaque genre de micro-organismes possède et est capable de mettre en jeu un certain appareillage chimique formé d'une façon déterminée, qui lui communique sa spécificité fonctionnelle. Cette spécificité est-elle constante ? Est-ce que les levures sont toujours productrices de l'alcool éthylique ?

On sait qu'il n'en est rien. La fermentation éthylique n'est pas le monopole de la cellule de levure ; en effet, on connaît sur ce sujet les travaux fondamentaux de Pasteur : « *Le caractère ferment peut être propre à tout organe, à toute cellule animale ou végétale, dit Pasteur, à la seule condition que, dans celle-ci, ait lieu momentanément ou d'une manière plus ou moins durable un travail chimique de vie ou d'assimilation et de désassimilation s'effectuant sans le concours de l'oxygène libre... (33).* »

D'autre part, les levures peuvent perdre leur spécificité fermentative et agir comme de véritables agents de combustion, tels que les moisissures. Ce résultat peut être obtenu lorsqu'on les oblige à vivre au large contact de l'air. Dans ces conditions, la production de l'alcool diminue d'une façon nette et les sucres se transforment en eau et CO_2 , la production de ces dernières substances est d'autant plus intense que le contact de l'air est plus large.

La modification d'une spécificité biochimique peut

(33) L. PASTEUR : Étude sur la bière. *Œuvres de Pasteur*, t. 5, p. 209.

être obtenue par des moyens autres que l'intervention de l'air.

Le caractère et les constituants des milieux de culture dans lesquels ces micro-organismes se développent jouent un rôle de premier ordre ; on connaît, à ce sujet, les travaux de Raulin.

Sans nous arrêter longtemps aux travaux du célèbre biologiste, nous pouvons rappeler que l'*Aspergillus niger*, cultivé dans le liquide classique de Raulin, donne un rendement maximum en mycélium et brûle intégralement le sucré soumis à son action. Mais, lorsqu'on supprime dans le liquide Raulin le fer et qu'on diminue trois ou quatre fois la quantité d'azote, on aperçoit tout de suite que l'*Aspergillus niger*, véritable agent de combustion qui transforme les glucides intégralement en CO_2 et en eau, devient ferment citrique.

Enfin, on voit que la spécificité fonctionnelle ou biochimique d'un micro-organisme dépend de la constitution chimique des milieux de culture. Les agents comburants les plus actifs, tels que les moisissures, peuvent devenir des ferments lorsqu'ils sont obligés de vivre en anaérobiose. Les levures, ferments les plus puissants, peuvent se transformer en véritables agents de combustion lorsqu'elles sont au large contact de l'air, lorsqu'elles vivent en aérobiose.

*
* *

Un des facteurs qui agit sur les spécificités biochimiques des ferments est la concentration du milieu en ions hydrogène. Voici quelques exemples typiques :

Dans une fermentation alcoolique déterminée par la levure, la concentration en ions hydrogène du milieu augmente progressivement : la levure, en partant,

par exemple, d'un milieu dont la concentration en ions hydrogène correspond à pH 6.7-6.8, amène cette concentration à pH 4, dans certaines conditions même à pH 3, voire 2,5 (34).

Dans toutes les fermentations naturelles, l'acidification du milieu est un fait réel. Dans de pareilles fermentations, la dégradation des glucides se fait toujours de la même façon, c'est-à-dire que les sucres se transforment presque intégralement en alcool et en CO_2 . La spécificité éthylique de la levure se manifeste, dans ce cas, d'une façon tout évidente.

Mais, lorsqu'on empêche cette acidité de se former, la spécificité alcoolique de la levure est modifiée. Ainsi, en présence de craie, la levure, cet agent de fermentation alcoolique par excellence, n'est plus productrice exclusive d'alcool, mais elle fait dégrader le sucre d'une telle manière que le produit principal de cette dégradation devient l'acide pyruvique, acide cétonique plus oxydé que le sucre (35). La levure acquiert ainsi, en apparence, une nouvelle spécificité, une spécificité pyruvique en quelque sorte. Et cette production de l'acide pyruvique a pour corollaire la production équimoléculaire de glycérol, produit plus réduit que le sucre.

La même intervention de la concentration en ions hydrogène du milieu se manifeste dans la fermentation butyrique.

Depuis Pasteur, on avait l'habitude de cultiver le ferment butyrique dans un milieu contenant de la craie.

Dans ces conditions, le produit de la dégradation du sucre est l'acide butyrique. A côté de cet acide

(34) M. SCHOEN, Le problème des fermentations. *Monographies de l'Institut Pasteur*, p. 141.

(35) M. SCHOEN : Problèmes de spécificité dans les processus de fermentation. *Annales de l'Institut Pasteur*, t. 37, 1931, p. 690.

en C, il se dégage de l'hydrogène, CO_2 , et comme produits accessoires on trouve très souvent de l'alcool butylique, comme l'a fait voir Pasteur.

Mais lorsqu'on laisse le ferment acidifier le milieu, ce qui a lieu dans des suspensions de céréales, par exemple, une tout autre forme de fermentation prend naissance, c'est la fermentation acétono-butylique (36).

Dans cette deuxième fermentation, quoiqu'on rencontre l'acide butyrique parmi les produits finaux, cet acide n'est plus le produit principal. Ce sont l'alcool butylique et l'acétone qui prennent ce rang.

Ces deux derniers exemples démontrent le rôle capital que joue la réaction du milieu dans la fermentation. La spécificité biochimique d'un micro-organisme ne dépend pas seulement de sa constitution morphologique, de son appareillage biochimique contenu dans sa petite cellule, mais, entre autres facteurs, elle dépend aussi de la réaction du milieu.

*
* *

Mais quelle que soit la spécificité du micro-organisme qui est responsable de la dégradation des glucides, quels que soient la constitution du milieu de culture, son caractère acide ou neutre, tout le monde est d'accord sur ce fait que cette dégradation ne s'opère point par une seule et unique réaction. Entre les glucides, matière première, et les produits ultimes de la dégradation, il existe des stades intermédiaires. Dans la formation de ces produits intermédiaires et leurs transformations, l'hydrogène joue un rôle prépondérant. Déjà, Lavoisier (37) a indiqué que la

(36) M. SCHOEN : Les bases scientifiques de quelques nouvelles industries de fermentation. *C. R. Dixième Congrès de Chimie Industrielle*, 1930.

(37) LAVOISIER : *Traité élémentaire de chimie. Œuvres*, t. 1, p. 101.

fermentation alcoolique doit être considérée comme une réaction oxydo-réductrice et il avait résumé cette manière de voir en ces termes :

« Les effets de la fermentation vineuse se réduisent donc à séparer en deux portions le sucre qui est un oxyde, à oxygéner l'une aux dépens de l'autre, pour former de l'acide carbonique, à désoxygéner l'autre aux dépens de la première pour en former une substance combustible qui est l'alcool. »

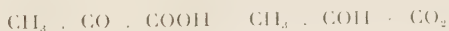
Ainsi, si l'on examine les divers produits principaux de cette fermentation alcoolique, on s'aperçoit que la formation de l'alcool aux dépens du sucre se fait par plusieurs stades intermédiaires. On pourrait encore admettre que, après l'activation de la molécule de sucre par la formation d'hexosesphosphate, c'est le méthylglyoxal qui se forme sous sa forme hydratée :



Dans chacune des deux molécules de méthylglyoxal, deux atomes d'hydrogène peuvent se séparer; de cette opération résulterait la production de l'acide pyruvique :



Ce dernier, alors, sous l'influence de l'action de la carboxylase, se transformerait en aldéhyde acétique et CO_2 .



D'autre part, les atomes d'hydrogène libérés et mobilisés agissent sur l'aldéhyde acétique et le transforment en alcool en l'hydrogénant :



Ainsi, dans la fermentation alcoolique, la mobilisation de l'hydrogène en milieu acide se fait de telle manière que les produits finaux sont l'alcool éthylique et CO_2 .

Mais les choses se passent autrement lorsqu'on fait évoluer la fermentation dans un milieu dont la réaction est maintenue, par la présence de la craie, à pH 6,7 environ. Cette modification de la réaction du milieu a pour conséquence le ralentissement de la vitesse de la réaction ultérieure au cours de laquelle l'acide pyruvique est décomposé, par rapport à la réaction productrice de cet acide cétonique. Ainsi, l'acide pyruvique formé n'étant pas décomposé sous l'action de carboxylase avec la même vitesse qu'il se forme, s'accumule en masse dans le milieu.

La production d'acide pyruvique a pour corollaire la production équimoléculaire de glycérol, qui provient de la réduction de l'autre fraction de sucre par l'hydrogène libéré.

Ce qui se passe dans la fermentation alcoolique, se passe encore dans les diverses autres formes de fermentation. C'est, en effet, la forme sous laquelle l'hydrogène est mobilisé et stabilisé, sous l'influence du microbe, qui imprime à la réaction fermentaire son caractère spécifique.

Il en est de même dans la fermentation acétonobutylique. Ici encore, c'est l'hydrogène qui joue un rôle important. Mais si, dans la fermentation éthylique, l'hydrogène, tout en jouant son rôle, ne se montre jamais en nature, la fermentation acétonobutylique comporte un dégagement d'hydrogène moléculaire. Dans cette fermentation, donc, l'hydrogène actif, atomique, tel qu'il prend naissance au cours de cette fermentation, s'est stabilisé à l'état inerte, moléculaire et c'est sur l'aldéhyde resté seul que

jouent les réactions oxydo-réductrices ultérieures. Ces réactions aboutissent, on le sait, à la production soit d'acide butyrique, soit d'un mélange d'alcool butylique et d'acétone. Le premier cas se présente dans le milieu maintenu neutre ; le second cas se manifeste dans le milieu qui peut s'acidifier librement. Ainsi, c'est encore la réaction du milieu qui oriente la marche de la réaction fermentaire.

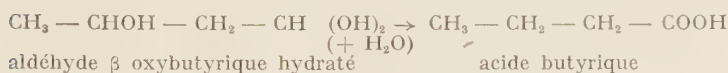
Voici un schéma emprunté à M. Schoen qui représente la marche de ces réactions (38) :

Stabilisation de l'hydrogène à l'état moléculaire

L'aldéhyde restant est aldolisé



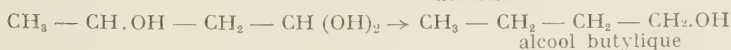
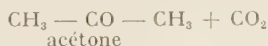
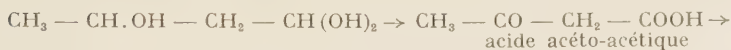
I. — Oxydo-réduction intramoléculaire en milieu neutre



FERMENTATION BUTYRIQUE



II. — Oxydo-réduction intermoléculaire en milieu acide



FERMENTATION ACÉTONO-BUTYLIQUE



(38) M. SCHOEN : Les problèmes actuels de la chimie des fermentations. *Annales des fermentations*, t. 1, 1935, p. 257.

*
* *

A la lumière de ce qui vient d'être brièvement résumé, examinons maintenant la fermentation mannitique. Ici, le rôle de l'hydrogène est tout à fait évident. La spécificité mannitique n'étant autre chose que le résultat de la fixation de l'hydrogène mobile sur une des molécules d'hexose, en particulier sur le fructose.

La spécificité mannitique a ceci de particulier que, tandis que dans tous les autres types de fermentation la spécificité est fonction de la réaction du milieu ou de la présence de substances fixatrices de certains corps intermédiaires, ici la spécificité biochimique, c'est-à-dire la faculté de produire du mannitol, dépend de la nature chimique du glucide soumis à la fermentation.

Les recherches qui feront l'objet des chapitres suivants ont été entreprises en vue d'étudier ce comportement particulier du ferment mannitique.

DEUXIÈME PARTIE

RECHERCHES EXPÉRIMENTALES

1^o CARACTÈRES GÉNÉRAUX DU FERMENT DE GAYON ET DUBOURG

Dans toutes nos recherches nous nous sommes servis du ferment mannitique de Gayon et Dubourg (*), lorsqu'on examine ce ferment au microscope, on constate qu'il se présente sous la forme de petits bâtonnets, très courts, rectangulaires, immobiles et souvent agglomérés les uns aux autres. Il se colore par la méthode de Gram. Le ferment de Gayon et Dubourg se développe à 37° dans l'eau de levure avec un très léger dégagement d'acide carbonique. Après quarante-huit heures de fermentation, les microbes tombent au fond du récipient.

Anaérobie facultatif, le ferment mannitique se laisse isoler sur gélose en tubes profonds. C'est de colonies parfaitement isolées que proviennent toutes nos cultures.

(*) Nous devons tous nos sincères remerciements à M. l'Abbé Dubaquié, directeur de la station œnologique de Bordeaux, successeur de Gayon et de Dubourg, qui a bien voulu nous procurer une souche de ce microbe précieux.

2^o MÉTHODES ANALYTIQUES EMPLOYÉES

a) *Préparation des milieux de culture*

Comme milieu de culture, nous avons employé dans nos expériences l'eau de levure préparée de la manière suivante :

On fait bouillir 30 gr. de levure de boulangerie, desséchée au préalable, dans un litre d'eau pendant vingt minutes, on laisse refroidir, on filtre et l'on amène à un litre.

La réaction d'un tel milieu varie entre pH 6,2 et 6,8, selon la race de levure employée, selon son âge et la manière de chauffer le bouillon. Avec une levure fraîche, qui est desséchée tout de suite à la température du laboratoire et avec un chauffage modéré pendant la préparation du bouillon, on obtient un milieu dont le pH est presque toujours égal à 6,7.

b) *La préparation du sucre interverti*

Nous avons préparé le sucre interverti en dissolvant 75 gr. de saccharose très pur, de sucre de canne, dans 400 cmc. d'une solution d'acide chlorhydrique à 2 p. 100 et chauffé au bain-marie entre 94° et 97° pendant une heure et demie.

L'apparition d'une teinte jaune à peine saisissable indique la fin de l'hydrolyse.

Cependant, après chaque hydrolyse, nous avons effectué un dosage du sucre interverti par la méthode de G. Bertrand, pour voir si vraiment la totalité du sucre était intervertie.

Après inversion, nous avons neutralisé la liqueur

acide par l'addition d'une quantité de carbonate de soude en poudre, correspondant exactement à la quantité d'acide contenue dans la liqueur. On sait que la moindre alcalinité entraîne la caramélisation du fructose, lorsqu'on chauffe à 120° pendant la stérilisation. Il faut même stériliser à part les solutions sucrées et les ajouter ensuite stérilement à l'eau de levure.

c) Stérilisation

Tous les flacons ont été flambés au four Pasteur avant de recevoir les milieux de cultures. Ils ont été ensuite stérilisés à l'autoclave à 120° pendant vingt minutes.

Le lait de craie, le sulfite de calcium, la mousse de platine, dont nous nous sommes servis dans nos expériences, ont été stérilisés pendant une heure à 120° dans des flacons préalablement flambés.

3° LES MÉTHODES DE DOSAGE EMPLOYÉES

a) Dosage du sucre et défécation des milieux

Lorsqu'on dose le sucre interverti par la méthode de Gabriel Bertrand (39) à l'état pur, c'est-à-dire avant de le mélanger avec le bouillon de levure, on obtient, bien entendu, des résultats tout à fait satisfaisants. Mais il n'en est plus de même lorsque le dosage est effectué sur le bouillon additionné de sucre, les chiffres obtenus dans ce dernier cas sont toujours inférieurs à ceux qu'on doit trouver. Il est à

(39) Gabriel BERTRAND : Dosage des sucres réducteurs. *Bulletin des sciences pharmacologiques*, t. 14, 1907, p. 7.

craindre que les matières contenues dans le bouillon empêchent la précipitation de l'oxyde cuivreux.

Les essais qui suivent ont été faits en vue d'élucider cette question.

Une solution contenant exactement 5 p. 100 de sucre interverti fut dosée dans différentes conditions. Le tableau ci-dessous montre les résultats obtenus dans ces essais :

TABLEAU I

Défécé par sous-acétate de plomb	SUCRE INTERVERTI	EN GRAMMES DANS 100 CC.	% DE SUCRE MANQUANT
}	dissous dans l'eau distillée pure	5,0	0
	après le mélange avec l'eau de levure	4,484	10,3
	après stérilisation de ce mélange	4,408	11,8
	la même liqueur dosée avec 40 cc.	4,607	7,86
	la même liqueur après 6 minu'es de caauffage	4,819	3,62
	la même liqueur sans défécation	4,819	3,62
	décoloration par le noir animal	4,259	14,96

Les chiffres de ce tableau montrent d'une façon évidente l'insuffisance du sous-acétate de plomb et du noir animal dans les défécations de jus sucrés.

Par un chauffage d'une plus longue durée, de six minutes au lieu de trois minutes, ou bien en supprimant la défécation, on arrive à des résultats satisfaisants, mais alors on sort, dans ces cas, des règles imposées par la méthode de G. Bertrand.

Nous nous sommes dès lors adressés à l'hydrate de zinc fraîchement préparé. Voici le mode opératoire : 10 cmc. d'eau de levure sucrée sont introduits dans un ballon jaugé de 110 cmc. et le tout est amené à 100 cmc.

D'autre part, nous avons préparé une solution semi-moléculaire de sulfate de zinc en dissolvant la quantité de carbonate de zinc nécessaire pour saturer 200 cmc. d'acide sulfurique normal.

5 cmc. de cette solution sont introduits dans le ballon jaugé.

Après les avoir bien mélangés avec le jus sucré, on ajoute encore 5 cmc. de soude normale ; on agite le contenu du ballon plusieurs fois. Ainsi, on obtient un précipité blanc d'hydroxyde de zinc. On chauffe pendant deux minutes dans un bain-marie bouillant. Après avoir refroidi et ramené au volume, on filtre.

Dans ces conditions, on obtient un filtrat complètement limpide qui ne donne jamais un deuxième précipité, comme le cas se présente lorsqu'on emploie le sous-acétate de plomb ou l'acide phosphotungstique.

Lorsqu'on dose le sucre dans le filtrat, on obtient des chiffres supérieurs à ceux qui ont été obtenus par les autres méthodes de défécation. Ainsi, pour la même solution qui avait servi dans les autres méthodes, c'est-à-dire pour une solution de 5 p. 100 de sucre, on trouve 4 gr. 895 p. 100 ; il manque donc seulement 2,1 p. 100 de sucre.

Dans les jus fermentés, l'acidité du milieu empêche quelquefois la précipitation totale de l'hydrate de zinc. Cet inconvénient peut être éliminé par la neutralisation du jus.

Il est à noter que cette méthode de défécation ne présente aucun inconvénient dans le dosage des aldoses par iodométrie.

Dans toutes nos expériences, nous avons déféqué nos milieux de culture par cette méthode, qui nous a paru être la meilleure pour le dosage de sucre en présence de l'eau de levure.

b) *Dosage des sucres aldéhydiques*

Nous avons dosé les sucres aldéhydiques par la méthode iodométrique ; cette méthode a été proposée pour la première fois, en 1917, par J. Bougault (40) ensuite modifiée par H. Collin et O. Liévin (41), Willstätter et G. Schudel (42), H. M. Judd (43), et enfin par J. L. Baker et H. F. E. Hulton (44).

Cette méthode est basée sur l'oxydation des *aldoses* par l'iode et leur transformation en acides correspondants suivant la formule :



Cette méthode est à employer tout particulièrement dans le cas où l'on désire doser un *aldose* en présence d'un *cétose*, le glucose en présence de fructose, par exemple.

On voit, d'après la formule ci-dessus, que 1 gr. d'hexose anhydre réagit avec 1 gr. 41 d'iode et que 1 gr. d'un biose, tel que le lactose ou le maltose, exige 0 gr. 743 d'iode.

Mode opératoire à suivre :

On ajoute 20 cmc. d'une solution décimale d'iode et 30 cmc. de soude décimale à 10 cmc. de la solution sucrée à analyser, qui ne doit pas renfermer plus de 1 p. 100 de sucre. Le mélange est abandonné

(40) J. BOUGAULT : Nouvelle méthode de dosage de sucre aldéhydique. *Journal de pharmacie et de chimie*, [7^e série] t. 16, 1917, p. 97.

(41) H. COLLIN et O. LIÉVIN : Dosage des sucres aldéhydiques par l'iode en milieu alcalin. *Bulletin de la Société chimique de France*, [4^e série] t. 23, 1918, p. 403.

(42) R. WILLSTAETTER et G. SCHUDEL : Bestimmung von Traubenzucker mit Hypojodit. *Berichte deutsch. chem. Ges.*, t. 51, 1918, p. 780.

(43) HILDA MARY JUDD : The iodometric estimation of sugars. *Biochemical Journal*, t. 14, 1918, p. 255.

(44) J. L. BAKER and H. F. E. HULTON : The iodometric estimation of sugars. *Biochemical Journal*, t. 14, 1918, p. 755.

à lui-même pendant cinq minutes à la température du laboratoire. On acidifie avec de l'acide sulfurique normal, et l'excès d'iode est titré avec une solution N/20 d'hyposulfite de soude en présence de quelques gouttes d'une solution d'amidon soluble.

Il importe que les solutions qui réagissent soient mélangées dans l'ordre : sucre, iode et alcali. Lorsqu'on mélange d'abord l'iode et l'alcali, on obtient des valeurs trop faibles.

1 cmc. d'iode N/10 correspond à 9 mgr. de glucose.

On tiendra compte, en outre, du fait que les matières azotées, telles que l'albumine d'œuf, les peptones sont également oxydées par l'iode. On aura donc soin de débarrasser les solutions sucrées des matières azotées qui les accompagnent, et nous avons appliqué dans ces cas la méthode au sulfate de zinc qui vient d'être indiquée.

c) Dosage de l'alcool

L'alcool produit dans nos expériences a été dosé par la méthode de E. Martin (45), modifiée par A. Boïdin (46), qui repose sur la transformation intégrale de l'alcool en acide acétique par oxydation, en milieu sulfurique, à l'aide du bichromate de potassium :



Réactifs :

1) Solution *titrée* de bichromate, renfermant 42 gr. 61 de sel pur et sec par litre.

(45) E. MARTIN : Détermination chimique du degré alcoolique des vins. *Le Moniteur Scientifique du docteur Quesneville*, t. 59, 1903, p. 570.

(46) A. BOÏDIN : Sur le dosage chimique de l'alcool. *Annales de la Brasserie et de la Distillerie*, t. 23, 1924-1925, p. 177.

1 cmc. de cette solution correspond à 10 mgr. d'alcool ou à 0 cmc. 0126 en volume.

II) Solution de sulfate double de fer et d'ammoniaque renfermant 92 gr. de ce sel par litre, plus 20 gr. d'acide sulfurique concentré et 1 gr. environ de fil de clavecin.

On détermine, *avant chaque opération* (ou série d'opérations consécutives) le titre de la solution II par rapport à la solution I.

Indicateur à employer: Solution diluée et fraîche de ferrieyanure de potassium (Méthode à la touche).

III) Acide sulfurique concentré.

Voici le mode opératoire tel qu'il est appliqué au laboratoire des fermentations de l'Institut Pasteur de Paris :

1^o *Distillation du liquide alcoolique.* — On soumet à la distillation 10 cmc. de liquide, dilué au préalable, de manière à ramener sa teneur en alcool aux environs de 1 à 2 p. 100.

On distille directement, *sans réfrigérant*, dans un petit ballon à fond rond muni d'un tube de dégagement coudé à angle aigu, dont la branche libre, d'une longueur de 30 cm. environ, plonge dans un tube à essai, dans lequel on a soufflé plusieurs renflements successifs.

Dans ce tube, on a introduit 20 cmc. de la solution I et 10 cmc. d'acide III. Le mélange, qui s'échauffe fortement, doit être fait immédiatement avant l'emploi.

On fait passer doucement à la distillation environ les 2/3 du contenu du ballon. L'alcool à l'état de vapeur s'oxyde au fur et à mesure qu'il arrive dans le tube collecteur.

2^o *Dosage du bichromate réduit.* — On verse le

contenu du tube dans un grand verre à pied, et on y joint les eaux de lavage du tube, qu'on peut rincer largement, de manière à amener le volume total à 400 cmc. environ.

On détermine le volume de la solution II, contenue dans une burette, qu'absorbe le bichromate restant.

3^o *Calcul.* — Soit N le volume de II en cmc. qu'exigent 20 cmc. de bichromate, 1 cmc de bichromate correspond à $N/20$ ou M cmc.

S'il a fallu, après l'opération, employer P. cmc. de la solution II, le volume de bichromate non réduit par

l'alcool est exprimé par $\frac{P}{M}$ et celui du bichromate qui

a servi à oxyder l'alcool est : $20 - \frac{P}{M} = R$.

$R \times 10$ mgr. = alcool *en poids* dans les 10 cc. employés,
 $R \times 0$ cc. 0126 = alcool *en volume* — — —

En multipliant le résultat trouvé par 10, on a l'alcool de 100 cmc. du liquide soumis à la distillation.

On calcule la teneur du liquide primitif en tenant compte de la dilution qu'on lui a fait subir.

d) *L'extraction et le dosage du mannitol*

1^o *Par l'alcool.* — On peut extraire et doser le mannitol par une extraction à l'alcool à chaud. En effet, le mannitol, qui se dissout dans l'alcool chaud, est insoluble dans l'alcool froid.

Nous avons extrait le mannitol de nos milieux et l'avons dosé par cette même méthode.

Pour obtenir un bon résultat nous avons fait bouillir le jus fermenté avec du noir animal (3 gr. pour 100 cmc.). Nous avons laissé refroidir et filtrer ensuite. Nous

avons lavé le filtre avec 100 ou 250 cmc. d'eau distillée bouillante, selon la quantité de jus. On obtient ainsi un filtrat tout à fait clair. Le jus ainsi obtenu est concentré sous le vide jusqu'à consistance sirupeuse.

Alors, on supprime le vide, on ajoute de l'alcool dans le ballon.

On fait bouillir l'alcool sur le bain-marie quelques minutes et on filtre sur un entonnoir en verre chauffé par l'eau chaude. Dans ces conditions, tout le mannitol se dissout et, lorsqu'on travaille avec soin, cette méthode peut être considérée comme satisfaisante.

2° *Par l'action de la benzaldéhyde.* — Quand on se trouve en présence de faibles quantités de mannitol, l'extraction par l'alcool ne peut servir ni au dosage ni à la caractérisation de ce polyalcool. Dans ce cas, il faut employer la méthode au benzaldéhyde.

Cette méthode, basée sur les observations de J. Meunier (47), a été déjà employée, dès 1904, par G. Bertrand (48), lors de ses recherches, devenues classiques, sur le sorbitol et la transformation de ce plurialcool en sorbose. On trouve une description détaillée de la méthode dans le *Guide pour les manipulations de chimie biologique* (49).

Cette méthode a trouvé un regain d'actualité lorsque J. Werder l'a appliquée, en 1929, à la recherche du sorbitol dans les vins de raisins additionnés frauduleusement de vins de fruits. Depuis cette époque, cette méthode a été étudiée et modifiée par divers auteurs.

(47) J. MEUNIER : Sur les composés que la mannite et la sorbite forment avec les aldéhydes. *Annales de chimie et de physique*, 6^e série, t. 22, 1891, p. 412.

(48) G. BERTRAND : Étude biochimique de la Bactérie du sorbose *Annales de Chimie et de physique* [8^e série], t. 3, 1904, p. 181.

(49) G. BERTRAND et P. L'HONAS : *Guide pour les manipulations de chimie biologique*, 1919, p. 111.

J. Werder (50), en cherchant les moyens de déceler des vins de fruits ajoutés intentionnellement dans des vins de raisins naturels, remarque que tous les vins de fruits contiennent du sorbitol.

Ainsi, il caractérise ces vins par la formation du benzalsorbitol.

Voici comment l'on procède d'après cette méthode :

100 gr. de boisson complètement fermentée sont agités avec 7 gr. de noir animal. On porte à l'ébullition, on filtre à chaud. Le filtrat est évaporé dans le vide jusqu'à consistance sirupeuse. On laisse refroidir et on ajoute 4 gouttes de benzaldéhyde et 1 cme. d'une solution 0,5 normale d'acide sulfurique.

Le tout est fortement agité et on laisse reposer pendant douze heures. Après ce délai, on ajoute au produit de la réaction, en agitant, environ 100 cme. d'eau distillée. En présence de jus de fruits la masse en réaction est entièrement solidifiée, tandis qu'avec les vins purs, la masse reste partiellement liquide.

L'identification du sorbitol s'opère par transformation de la combinaison benzaldéhydique en hexacétylsorbitol bien cristallisé.

Plusieurs autres auteurs ont étudié et plus ou moins modifié cette méthode. Ainsi Fiesselmann (51) applique cette méthode à l'analyse du cidre et du poiré ; cet auteur souligne que la présence de sucre interverti ne gêne aucunement les résultats de l'analyse.

A. Schrempf (52) cherche les causes des erreurs de cette méthode et les attribue à une prise d'échantillon trop faible.

(50) J. WERDER : Das Sorbitverfahren zum Nachweis von Obstwein. *Zeitschrift für Untersuchung der Lebensmittel*, t. 58, 1929, p. 123.

(51) FIESELMANN : La caractérisation du vin de fruits d'après le procédé à la sorbite. Résumé dans *Annales de la Brasserie et de la Distillerie*, t. 28, 1929-1930, p. 262.

(52) A. SCHREMPF : Der Nachweis von Obstwein im Traubenwein nach dem Werder'schen Sorbitverfahren. *Chemiker Zeitung*, 1931, p. 52.

Wuestenfeld et H. Kreipe (53) appliquent cette méthode à la recherche du vinaigre de fruit.

G. Reif (54) caractérise le benzalsorbitol par une dissolution dans l'acide sulfurique, de densité 1,84 : dans ces conditions, ce composé donne une coloration rouge orange.

B. Bleyer et W. Diemair (55 et 56) ont modifié cette méthode ; ils défèquent le sirop par l'alcool méthylique et distillent cet alcool ensuite.

Enfin, C. Von der Heide et K. Hennig (57) appliquent cette méthode, en la modifiant, d'une part, au dosage du sorbitol et, d'autre part, à la caractérisation du mannitol.

C'est cette dernière méthode que nous avons appliquée à la recherche du sorbitol et du mannitol.

Voici le mode opératoire : 400 cmc. de milieu fermenté reçoivent 7 gr. de noir animal ; on agite fortement et puis l'on fait bouillir pendant quinze minutes ; on filtre à chaud et on lave à plusieurs reprises à l'eau chaude, au moins six fois.

Dans le cas où le milieu est maintenu neutre par la présence de craie, il faut éliminer les sels de calcium formés, par précipitation à l'oxalate d'ammoniaque ; la quantité d'oxalate ajoutée ne doit jamais dépasser la quantité nécessaire à la précipitation intégrale du calcium.

(53) H. WUESTENFELD et H. KREIPE : Deutsche Essigind. Résumés dans *Annales de la Brasserie et de la Distillerie*, t. 35, 1931, p. 183 ; t. 30, 1932, p. 138.

(54) G. REIF : Der Nachweis des Benzalsorbitols beim Werder'schen Sorbitverfahren durch eine Farbenreaktion mit Aceton. *Zeitschrift für Untersuchung der Lebensmittel*, t. 62, 1931, p. 82.

(55) B. BLEYER, W. DIEMAIR et G. LIX : Zur Kenntnis des Sorbitnachweises im Wein, *Ibidem*, t. 64, 1932, p. 337.

(56) B. BLEYER, W. DIEMAIR et G. LIX : Zur Kenntnis des Sorbitnachweises im Wein. *Ibidem*, t. 64, 1932, p. 336.

(57) C. VON DER HEIDE ET K. HENNIG : Zum Nachweis von Obstwein in Traubenwein mit Hilfe des Dibenzalsorbitols nach J. Werder. *Ibidem*, t. 57, 1929, p. 240.

Après filtration, nous avons concentré le jus fermenté jusqu'à consistance sirupeuse. Ensuite, nous avons introduit 0,5 cmc. de benzaldéhyde, 4 cmc. d'une solution normale d'acide sulfurique, et agité fortement pendant une heure (la quantité de benzaldéhyde et d'acide sulfurique varie selon l'expérience), puis laissé reposer dans la glacière pendant une nuit.

On recueille le précipité sur un creuset de Schott. On lave avec l'eau distillée jusqu'à ce que l'eau de lavage ne contienne plus trace d'acide sulfurique. On verse alors sur le précipité de l'alcool à plusieurs reprises, on chasse ainsi toute l'eau du précipité. On remplace l'alcool par l'éther pour éliminer les dernières traces d'eau.

On met alors le creuset avec le précipité dans un appareil à extraction et on extrait au benzol pendant deux ou trois heures.

Le benzol est éliminé par distillation. La dernière petite quantité de ce dernier est éliminée par évaporation dans un dessiccateur à acide sulfurique. Alors, on obtient du dibenzalsorbitol qui fond à 162° ou bien du tribenzalmannitol dont le point de fusion est situé entre 217-220°.

*e) Caractérisation et dosage de l'acide acétique
et des acides lactique et pyruvique*

Nous avons caractérisé et dosé l'acide acétique par la méthode de Duclaux et l'acide lactique a été extrait en nature par l'éther et caractérisé par son sel de zinc.

La détermination quantitative de l'acide lactique a été faite par la différence entre la quantité de l'acide acétique et l'acidité totale.

Quant au glycérol, c'est par la méthode bien connue de Pasteur que cet alcool a été dosé.

TROISIÈME PARTIE

— —

L'ACTION DU FERMENT MANNITIQUE SUR LES SUCRES FERMENTESCIBLES

Dans nos premières recherches nous avons étudié la marche de la dégradation des divers sucres sous l'influence de l'action du ferment mannitique en faisant varier la réaction du milieu.

1^o L'ACTION DU FERMENT MANNITIQUE SUR LE SUCRE INTERVERTI

A) La marche de la fermentation en milieu acide

L'étude de la marche de la fermentation en milieu acide comporte trois séries d'expériences. La première série a porté sur une solution à 2,86 gr. p. 100. Dans la deuxième série la solution renfermait 3,67 gr. de sucre alors que dans la troisième série, c'est une solution à 1,34 gr. p. 100 qui a servi à l'expérience.

La fermentation s'opère à 37°. A cette température, elle se déclare rapidement, dix heures après ensemencement.

La marche de la fermentation a été ainsi étudiée : nous avons dosé le sucre restant, l'acide produit et l'alcool formé. Nous avons suivi, par ailleurs, le changement de rotation du liquide fermenté. Les chiffres

obtenus dans cette première expérience sont consignés dans le tableau ci-dessous.

TABLEAU II

DURÉE EN JOURS	SUCRE RESTANT EN GR. % CC. DU LIQUIDE DE CUL- TURE	SUCRE CONSOMMÉ EN GR. % CC. DU LIQUIDE DE CUL- TURE	SUCRE CONS. % DU SUCRE OFFERT	ACIDITÉ FORMÉE EXPRIMÉE EN AC. LAC. GR. PAR LITRE (par titration)	POUR 100 CC. ALCOOL EN MG	ROTATION 1 = 2 dcm
0	2,86	0	0		0	— 1°
2	2,13	0,73	25,3	0,65	0	— 0°88
4	1,76	1,1	37,4	1,74	0	0°
5	1,59	1,27	44,4	1,9	0,0066	+ 0°66
6	»	»	»	»	»	+ »
8	»	»	»	»	»	»
12	»	»	»	»	»	»

Il ressort des chiffres du tableau II que la fermentation s'arrête au bout de cinq jours et que la consommation du sucre n'atteint que 44,4 p. 100 dans ce cas.

La production d'acide, calculée en acide lactique, atteint 1 gr. 9 par litre. La production d'alcool est minime, 6,6 mgr. d'alcool sont produits pour 100 cmc. du milieu. Quant à la rotation, celle-ci partant de — 1°, passe par 0, pour s'arrêter à + 0°66. Cette modification de la rotation indique déjà une certaine électricité du ferment mannitique pour le glucose, fait que nous étudierons plus loin avec plus de détails.

Dans cette expérience, bien que la quantité totale du sucre consommé soit supérieure à celle de la première expérience, la consommation par rapport au sucre offert est plus faible, 38,31 p. 100 au lieu de 44,5. La production d'alcool est tout à fait négligeable. Les quantités obtenues ne sont pas dosables

par les méthodes habituelles. La quantité d'acide formé est sensiblement augmentée, 2,56 au lieu de 1,9. Ici, le changement de la rotation a la même allure que dans la première expérience.

TABLEAU III

DURÉE EN JOURS	SUCRE RESTANT EN GR. % CC DU LIQUIDE DE CUL- TURE	SUCRE CONSOMMÉ EN GR. % CC. DU LIQUIDE DE CUL- TURE	SUCRE CONS. % DU SUCRE OFFERT	ACIDITÉ FORMÉE EXPRIMÉE EN AC. LAC. GR. PAR LITRE (par titration)	POUR 100 CC. ALCOOL EN MGR.	ROTATION 1 = 2 dcm
0	3,67	0	0		0	1°3
1	3,209	0,48	12,96	0,86	0	1°1
2	2,96	0,71	19,28	1,24	0	1°0
3	2,72	0,95	25,8	1,73	0	0°97
5	2,26	1,41	38,31	2,56	0	0°90
8	»	»	»	»	0	

La troisième série d'expériences a porté sur un volume plus élevé pour permettre de suivre la marche de la fermentation pendant une durée plus longue. Elle s'est achevée en douze jours. Sur 1 gr. 3 de sucre offert, 0 gr. 87 ont été consommés. La consommation a donc été de 65 p. 100.

La quantité d'acide produit est proportionnellement plus élevée que dans les deux premières expériences. Il en est de même pour la production de l'alcool. Le changement de la rotation suit toujours la même règle. Le tableau IV montre les chiffres obtenus dans les analyses effectuées au cours de cette expérience.

D'autre part, pour suivre la consommation du glucose au cours de la fermentation, comparativement à celle du fructose, nous avons dosé le glucose par iodométrie ; tandis que le sucre réducteur total est

TABLEAU IV

DURÉE EN JOURS	SUCRE RESTANT EN GR. % CC. DU LIQUIDE DE CUL- TURE	SUCRE CONSOMMÉ EN GR. % CC. DU LIQUIDE DE CUL- TURE	SUCRE CONS. % DU SUCRE OFFERT	ACIDITÉ FORMÉE EXPRIMÉE EN AC. LAC-GR. PAR LITRE (par titration)	GLUCOSE RESTANT EN GR. % CC. DU LIQUIDE CULTURE	POUR 100 CC. ALCOOL EN MGR.	ROTATION 1 = 2
0	1,338	0	0	1,2	0,683	0	— 0°16
8	0,84	0,5	37,4	1,1	—	4	+ 0°55
13	0,47	0,87	65	1,8	0,4	9	+ 0°66
17	0,47	0,87	65	1,8	0,4	9	+ 0°66
20	»	»	»	»	»	»	+ »

dosé par la méthode de G. Bertrand. Ce mode opératoire permet de doser séparément le glucose et le fructose consommé. On voit que, dans cette fermentation, le fructose est plus rapidement attaqué que le glucose. La production de mannitol est de 0 gr. 055 pour 0 gr. 87 de sucre consommé, c'est-à-dire que 6,3 p. 100 du sucre total ou bien 9,1 p. 100 du fructose sont transformés en mannitol. Les chiffres sont consignés dans le tableau V.

TABLEAU V

Glucose consommé en gr. % cc. du liquide de culture.	0 gr. 27
Fructose consommé en gr. % cc. du liquide de culture	0 gr. 60
Fructose	
Glucose	2.2 1
Acidité fixe formée exprimée en acide lactique, gr. par litre	0 gr. 9
Acidité volatile formée exprimée en acide acétique, gr. par litre	0 gr. 57
Mannitol formé	0 gr. 055
Mannitol formé % du sucre consommé	6,3 %
Mannitol formé % du fructose consommé.	9,1 %

Quant aux acides volatils, il s'agit bien de l'acide acétique comme le montre le tableau VI.

Si l'on compare avec les chiffres de Duclaux, on verra qu'ils concordent avec ces derniers. La quantité d'acide volatil atteint 0 gr. 67 par litre, tandis que la quantité d'acide fixe est de 0 gr. 9 par litre.

TABLEAU VI

CHIFFRES OBTENUS	7,9	14,26	23,8	31,7	41,27	50,0	61,9	73,0	86,5	100
Chiffres de Duclaux	7,4	15,2	23,4	32,0	40,9	50,5	60,6	71,9	84,4	100

Ces trois expériences montrent que la marche de la fermentation dépend de la concentration du milieu de culture en sucre. La consommation du sucre est ainsi réglée par les produits du métabolisme et, en premier lieu, par l'acide formé. En effet, une fois le pH minimum atteint, la fermentation s'arrête. Ce pH minimum pour le ferment de Gayon et Dubourg est égal à 3,4 comme nous avons pu l'établir.

*B) La marche de la fermentation
dans le milieu maintenu neutre*

Dans trois autres séries d'expériences, nous avons maintenu neutre la réaction du milieu par l'addition de craie.

En présence de craie, la marche de la fermentation, comme le fait voir le tableau VII, est beaucoup plus rapide que dans le milieu acide. Ainsi, le premier jour, 14,2 p. 100 du sucre offert sont déjà consommés, et la fermentation ne s'arrête que lorsque tout le sucre offert est consommé. En vingt jours, 96,7 p. 100 du sucre offert sont consommés. La quantité d'acide

produit, calculée en acide lactique et déterminée d'après la teneur du milieu en chaux dissoute, est six fois plus élevée qu'en milieu acide. Il en est de même de la production de l'alcool, tandis qu'en milieu acide la production de l'alcool n'atteint même pas 7 mgr. pour 100 cnc.; en présence de la craie, elle est de 0 mgr. 165 pour 100 cnc. de milieu.

TABLEAU VII

DURÉE EN JOURS	SUCRE RESTANT EN GR. % CC. DU LIQUIDE DE CUL- TURE	SUCRE CONSOM- MÉ EN GR. % CC. DU LIQUIDE DE CULTURE	SUCRE CONS. % DU SUCRE OFFERT	ACIDITÉ FORMÉE L'EXPRIMÉE EN AC. LAC. GR. PAR LITRE (par titration)	POUR 100 CC. ALCOOL EN MGR.	ROTATION 1 2
0	3,22	0	0		0	1°12
1	2,76	0,46	14,2	1,7	0	0°88
2	2,5	0,722	22,6	3,46	0,055	0°55
4	1,31	1,91	59,4	7,66	0,076	0°41
6	0,70	2,52	78,2	9	0,113	0°16
8	0,526	2,69	83,6	10	0,122	0°05
11	0,325	2,90	93,1	10,72	0,161	0°
18	0,175	3,045	94,5	11,00	0,163	0°
20	0,105	3,115	96,7	11,46	0,165	0°

Le changement de la rotation s'opère cependant dans la même direction que dans les milieux acides. Elle commence à gauche ($-1^{\circ},2$), passe par 0 pour arriver à $+0^{\circ},47$, puis diminue progressivement pour arriver à la fin à 0° , lorsque tout le sucre est consommé.

Dans les deux expériences suivantes, où la quantité de sucre offert a été doublée, nous avons arrêté la fermentation au bout de douze jours. Comme le montrent les tableaux VIII et IX, ces deux expériences confirment la régularité de la marche de la fermentation déjà signalée. Ici encore, la consommation du sucre, la production de l'alcool et de l'acide, sont bien

plus élevées que dans le milieu acide. Au bout de douze jours, 74,5 p. 100 du sucre offert sont consommés. La rotation suit toujours la même règle.

TABLEAU VIII

DURÉE EN JOURS	SUCRE RESTANT EN GR. % CC. DU LIQUIDE DE CUL- TURE	SUCRE CONSOM- MÉ EN GR. % CC. DU LIQUIDE DE CULTURE	SUCRE CONS. % DU SUCRE OFFERT	ACIDITÉ FORMÉE EXPRIMÉE EN AC. LAC. GR. PAR LITRE (par titration)	POTR 100 CC. ALCOOL EN MGR.	ROTATION 1 = 2
0	6,33	0	0		0	— 1°55
8	2,084	4,25	67	10	5,77	+ 2°58
12	1,61 ²	4,72	74,5	12	141	+ 2°06

Dans cette expérience, pour 4 gr. 72 de sucre consommé, il se produit 1 gr. 33 de mannitol. C'est-à-dire que 20 p. 100 du sucre interverti se sont transformés en mannitol. L'autre expérience donne un résultat tout à fait analogue : 1 gr. 33 de mannitol, soit 20 p. 100 du sucre interverti consommé, sont formés.

Dans l'expérience qui suit, nous avons dosé le glucose par iodométrie. Ici encore on voit que le fructose est plus facilement attaqué par le ferment mannitique que le glucose. Ainsi, après quatre jours de fermentation, sur les 3 gr. 50 de sucre consommé, 2 gr. 16 sont représentés par le fructose ; et le rapport entre le glucose consommé et le fructose consommé est ainsi 1,6. Après douze jours de fermentation, sur les 4 gr. 076 de sucre consommé, 2 gr. 216 sont représentés par le fructose. Le rapport entre le glucose et le fructose consommés au bout de douze jours est de 1/1,08. Cette diminution du rapport entre les quantités relatives des deux sucres consommés s'explique simple-

ment par le fait que, au fur et à mesure que la fermentation s'achève et que la majeure partie du fructose est déjà consommée, la fermentation se poursuit aux dépens du glucose resté seul.

Quant à la production du mannitol, elle atteint 1 gr. 29 pour 4 gr. 076 de sucre consommé, ce qui correspond à 19,5 p. 100 de celui-ci. Rapporté au fructose, ce rendement s'élève à 60,96 p. 100. Nous avons dosé le mannitol par dissolution de celui-ci dans l'alcool chaud et par cristallisation à froid. Avant de doser le mannitol, nous avons répété la cristallisation plusieurs fois jusqu'à ce qu'on arrive à une blancheur parfaite : au moins trois fois.

Voici les chiffres obtenus dans cette troisième expérience :

TABLEAU IX

DURÉE EN JOURS	SUCRE RESTANT EN GR. ⁰ CC. DU LIQUIDE DE CUL- TURE	SUCRE CONSOM- MÉ EN GR. ⁰ CC. DU LIQUIDE DE CULTURE	SUCRE CONS. % DU SUCRE OFFERT	ACIDITÉ FORMÉE EXPRIMÉE EN AC. LAC. GR. PAR LITRE	GLUCOSE RES- TANT EN GR. % CC. DU LIQUIDE CULTURE	POUR 100 CC. ALCOOL EN MGR.	ROTATION 1 — 2
0	6,5	0	0	0	3,26	0	— 1°60
4	3,	3,5	46,2	7,3	1,91	15	+ 1°65
9	2,43	4,1	62,8	11,3	1,45	11	+ 2°24
12	2,45	4,076	62,4	11,4	1,3	7	+ 3°00

La production de l'acidité volatile est également supérieure à celle que l'on observe dans les milieux acides. Les chiffres obtenus correspondent bien aux chiffres de l'acide acétique de Duclaux. La quantité de cet acide volatil formé est 2 gr. 76 par litre (tableau X).

* * *

Dans la fermentation du sucre interverti, on constate ainsi que le ferment mannitique manifeste une électivité qui se traduit par l'attaque plus rapide du fructose que du glucose. Cette électivité peut être mise en évidence avec une netteté particulière, lorsqu'on conduit la fermentation en milieu maintenu neutre.

Le rapport entre les quantités ^{consommées} de fructose et de glucose, dans le milieu acide, est de 2,2 à la fin de la fermentation (tableau V), tandis que ~~consommées~~ dans le milieu maintenu neutre, au bout des trois premiers jours, ce rapport est égal à 1,57 et le douzième jour il tombe à 1,08 (tableau X).

TABLEAU X

Glucose consommé en gr. % cc. du liquide de culture.	1 gr. 96
Fructose consommé en gr. % cc. du liquide de culture	2 gr. 116
Fructose / après 3 jours	1,57 / 1
Glucose) après 12 jours	1,08 / 1
Acidité fixe formée exprimée en acide lactique, gr. par litre	7 gr. 65
Acidité volatile formée exprimée en acide acétique, gr. par litre	2 gr. 36
Mannitol formé	1 gr. 29
Mannitol formé % du sucre consommé	19,5
Mannitol formé % du fructose consommé.	60,96

Le changement de la réaction du milieu agit sur la marche de la fermentation d'une manière décisive. Tout d'abord, c'est la vitesse avec laquelle s'effectue l'acte fermentatif qui diffère d'un cas à l'autre. La quantité de sucre consommé dans l'unité de temps, dans le milieu neutre, est trois fois et demie supérieure à celle qui est consommée dans le milieu acide. Cet état de chose explique par ailleurs pourquoi, dans le

milieu acide, la valeur du rapport entre le fructose et le glucose consommés est plus élevée que dans le cas du milieu neutre ; en effet, dans le premier cas, ce rapport est égal à 2,2, alors qu'il est de 1,57 dans le second cas et, après douze jours, ce dernier tombe à 1,08 à la fin de la fermentation. La vitesse de la fermentation dans le milieu acide étant inférieure à celle du milieu neutre, le ferment, dans le premier cas, n'agit que sur son aliment préféré, le fructose, tandis que, dans le milieu neutre, la vitesse étant beaucoup plus grande, le glucose aussi se trouve attaqué.

Mais le fait capital, c'est que le changement de réaction du milieu agit sur la spécificité biochimique du ferment. En effet, tandis que, dans le milieu acide, la production de l'alcool est négligeable, dans le milieu maintenu neutre, 13 p. 100 du sucre consommé se sont transformés en alcool.

La réaction neutre peut donc augmenter la fonction alcoogène du ferment mannitique, fonction qui se manifeste à peine dans le milieu acide.

Quant au mécanisme profond de cette modification de la fonction biochimique du ferment, les expériences qui vont suivre jetteront quelque lumière sur cette question importante.

Il est digne de remarque que la modification de la réaction du milieu influe également sur la production du mannitol.

L'acide lactique obtenu dans nos essais de fermentation mannitique est un mélange d'acide lactique droit et gauche ; en proportion égale, puisque les solutions de leur sel de Zn ne dévient pas la lumière polarisée.

2° L'ACTION DU FERMENT MANNITIQUE SUR LE GLUCOSE

A) *La marche de la fermentation en milieu acide*

Pour étudier l'action du ferment mannitique sur le glucose, nous avons fait quatre séries d'expériences, dont deux en milieu acide et deux en milieu maintenu neutre.

La première série d'essais en milieu acide a été faite avec des solutions glucosées à 1 gr. 39 p. 100. Le glucose fermente avec une vitesse moindre que le sucre interverti, comme le font voir les chiffres consignés dans les tableaux XI et XII. Tandis que dans la fer-

TABLEAU XI

DURÉE EN JOURS	GLUCOSE RES- TANT EN GR. % CC. DU LIQUIDE DE CULTURE.	GLUCOSE CON- SOMMÉ EN GR. % CC. DU LIQUIDE DE CULTURE.	GLUCOSE CONS. % DU GLUCOSE OF- FERT	ACIDITÉ FORMÉE EXPRIMÉE EN AC. LAC. GR. PAR LITRE. (par titration)	POUR 100 CC. ALCOOL EN MGR.	ROTATION (l = 2 dm)
0	1.39	0	0	0	0	+ 1°55
1	1.25	0.14	10.2	1.35	9.7	+ 1°42
2	0.94	0.45	32.4	2.53	42	+ 1°36
4	0.879	0.516	37	2.87	54	+ 1°12
7	0.828	0.567	38.5	2.87		+ 0°93
13	0.754	0.64	46	3.0	62	+ 0°80
15	"	"	"	"	"	"

mentation du sucre interverti, en milieu acide, la fermentation s'achève en 6 ou 7 jours, avec le glucose, elle dure de 11 à 14 jours. Sur 1 gr. 39 de glucose offert, 0 gr. 64 sont consommés. La production d'acide s'élève à 3 gr. par litre. La production de l'alcool, à la fin de la fermentation atteint 64 mgr. p. 100 cmc. de bouillon,

c'est-à-dire 18 gr. 9 p. 100 de glucose consommé se sont transformés en alcool. La rotation diminue avec la consommation.

Nous avons effectué une deuxième série d'expériences avec un milieu qui contenait 1 gr. 3566 de glucose. Les résultats obtenus confirment ceux qu'on a constatés dans la première expérience. Comme dans la première expérience, ici aussi la fermentation se fait lentement. Elle s'est achevée en onze jours ; 0 gr. 40 de sucre ont été consommés. La production d'acide atteint 1 gr. 7 par litre, 28 mgr. d'alcool ont été produits, ainsi que le montre le tableau XII.

TABLEAU XII

DURÉE EN JOURS	GLUCOSE RES- TANT EN GR. % CC. DU LIQUIDE DE CULTURE	GLUCOSE CONSOM- MÉ EN GR. % CC. DU LIQUIDE DE CULTURE	GLUCOSE CONS. % DU GLUCOSE OFFERT	ACIDITÉ FOR- MÉE EXPRIM. EN AC. ACÉTIQUE GR. PAR LITRE. (par titration)	POUR 100 CC. ALCOOL EN MGR.	ROTATION (d)
0	1,3566	0	0	0	0	+ 0°94
2	1,354	0,0026	0,1	0	0	+ »
4	1,009	0,347	25,6	1,49	21	+ 0°86
6	0,99	0,336	26,9	1,52	22,5	+ 0°80
9	0,969	0,387	28,5	1,7	24	»
11	0,956	0,40	29,5	1,7	28	»
15	»	»	»	»	»	»
22	»	»	»	»	»	»

On n'a pu déceler l'existence du mannitol parmi les produits de fermentation. La fermentation du glucose par le ferment mannitique ne fournit que de l'alcool éthylique, de l'acide acétique et de l'acide lactique.

B) *La marche de la fermentation
dans le milieu maintenu neutre*

Nous avons fait fermenter le glucose dans un milieu maintenu neutre par la présence de craie. La fermentation est toujours lente. Pour faire fermenter la presque totalité des 3 gr. 65 de glucose offert, il a fallu cinquante huit jours. Au bout de trente-huit jours, 98,8 p. 100 du sucre sont consommés.

Quant à la nature et à la quantité des acides formés, on est bien en présence d'acide lactique et d'acide acétique. Nous avons caractérisé l'acide lactique par le lactate de zinc et l'acide acétique par la méthode de Duclaux.

Dans la fermentation du glucose en présence de craie, c'est l'acide lactique qui domine ; la production de l'acidité totale, calculée en acide lactique, s'élève à 17 gr. par litre, dont 15 gr. calculés comme acide fixe et 1 gr. 58 comme acide volatil.

La production de l'alcool dans la fermentation du glucose est plus élevée que celle qu'on rencontre dans la fermentation du sucre interverti. 432 mgr. ont été produits au cours de seize jours de fermentation, ensuite la quantité de l'alcool diminue, tandis que l'acidité augmente. Il se peut que l'alcool se soit oxydé dans les quatorze derniers jours.

On a dosé par la méthode de Pasteur le glycérol formé. 99 mgr. de glycérol ont pris naissance pour 100 cmc. du milieu.

Dans cette fermentation non plus, le mannitol n'a pas pu être décelé parmi les produits de la fermentation.

Ainsi, le ferment mannitique change de fonction lorsqu'on lui offre du glucose seul, il ne peut plus agir comme un ferment « hydrogénant » directement la molécule de l'hexose sur laquelle on l'a fait agir.

Ce sucre aldéhydique est dégradé; l'alcool, l'acide lactique, l'acide acétique et le glycérol sont les produits de la fermentation. Dans le milieu neutre, il manifeste son action fermentative comme s'il était un ferment alcoolique et lactique, alors que, dans le milieu acide, la production de l'alcool et de l'acide lactique reste insignifiante. Les tableaux XIII et XIV montrent les chiffres obtenus dans cette série.

TABLEAU XIII

DURÉE EN JOURS	GLUCOSE RES- TANT EN GR. % CC. DU LIQUIDE DE CULTURE	GLUCOSE CON- SOMMÉ EN GR. % CC. DU LIQUIDE DE CULTURE	GLUCOSE CONS. % DU GLUCOSE OF- FERT	ACIDITÉ FIXE FORMÉE EXPR. EN AC. LACT. GR. PAR LITRE (par sous- traction)	ACIDITÉ VOLATILE FORM. EXPR. EN AC. ACÉTIQUE GR. PAR LITRE (DUCLAUX)	POUR 100 CC. ALCOOL EN MGR.	ROTATION (1 = 2)
0	3,65	0	0		0	0	+ 2°42
2	2,45	1,2	32,7	3,73	0,879	103	+ 2°08
4	1,95	1,7	46,2	—	—	229	—
10	1,23	2,42	66,3	—	—	—	+ 1°55
12	0,855	2,8	76,6	11,47	1,28	416	+ 1°01
14	0,835	2,82	77,1	»	—	415	+ 1°01
16	0,368	3,28	82,9	13,64	1,41	432	+ 0°74
18	0,59	3,06	83,8	—	—	373	+ 0°66
30	0,044	3,609	98,8	15,22	1,585	337	+ 0°48

TABLEAU XIV

DURÉE EN JOURS	GLUCOSE RES- TANT EN GR. % CC. DU LIQUIDE DE CULTURE	GLUCOSE CONS. EN GR. % CC. DU LIQUIDE DE CUL- TURE	GLUCOSE CONS. % DU GLUCOSE OF- FERT	ACIDITÉ FIXE FORMÉE EXPR. EN AC. LACT. GR. (par soustraction)	ACIDITÉ VOLA- TILE FORM. EXPR. EN AC. ACÉTIQUE GR. PAR LITRE (DUCLAUX)	POUR 100 CC. ALCOOL EN MGR.	ROTATION (1 = 2)
0	3,97	0	0	0	0	0	2°66
2	2,744	1,226	30,9	3,79	0,89	105	1°86
4	2,283	1,687	42,5	5,22	9,09	220	1°58
8	1,767	2,183	35	8,56	1,2	381	1°17
12	1,443	2,528	63,7	9,09	1,12	390	1°08
16	1,00	2,97	75	12,1	1,27	392	»

Dans cette expérience, 99 mgr. de glycérol ont pris naissance pour 100 cmc. de milieu.

3^o L'ACTION DU FERMENT MANNITIQUE SUR LE FRUCTOSE SEUL

A) *La marche de la fermentation en milieu acide*

Le ferment mannitique de Gayon et Dubourg agit sur le fructose d'une tout autre façon que sur les autres sucres. Il transforme ce sucre cétonique en mannitol, d'où, d'ailleurs, son nom. Deux ^{atomes} ~~molécules~~ d'hydrogène qui prennent naissance au cours de la dégradation d'une molécule de fructose, se fixent sur l'autre molécule qui est transformée en mannitol, ce qu'on peut exprimer par la formule suivante :



Pour étudier la transformation du fructose en mannitol, nous résumons ici quatre séries d'expériences dont deux en milieu acide et deux en milieu neutre. Pour empêcher une altération éventuelle du fructose par le chauffage, au cours de la stérilisation, nous l'avons stérilisé à part à 108° pendant dix minutes et le bouillon stérile est alors additionné stérilement à la solution lévulosée.

Le pH de la solution est ajusté à 6,8.

Pour suivre la marche de la fermentation, nous avons dosé, comme dans les expériences précédentes, le fructose restant, l'acidité produite, l'alcool et le mannitol formés.

Dans la première expérience, en sept jours, sur 1 gr. 02 de fructose offert, 41,2 p. 100 sont consommés.

Pour cette quantité de fructose dégradé, il s'est formé 1 gr. 5 d'acidité totale calculée en acide acétique qui a été caractérisé par la méthode de Duclaux.

TABLEAU XV

DURÉE EN JOURS	FRUCTOSE RES- TANT EN GR. % CC. DU LIQUIDE DE CULTURE	FRUCTOSE CON- SOMMÉ EN GR. % CC. DU LIQUIDE DE CULTURE	FRUCTOSE CONS. % DU FRUCTOSE OFFERT	ACIDITÉ FORMÉE EXPRIM. EN AC. ACÉTIQUE GR. PAR LITRE (par titration)	POUR 100 CC. ALCOOL EN MGR.	ROTATION (α_D^{20})
0	1,21	0	0	pH = 6,8	0	— 2°2
1	0,96	0,06	5,8	0,8	3	— 1°86
3	0,725	0,30	2,9	1,2	3	— 1°64
7	0,6	0,42	41,2	1,5	4,5	— 1°20
9	»	»	»	»	»	—

La production de l'alcool est très minime, 4 mgr. 5. La rotation gauche diminue avec la consommation du fructose. Le tableau XV montre les chiffres obtenus dans cette série.

Comme le fait voir le tableau XVI, la quantité d'acide acétique atteint 0 gr. 78 par litre et celle de l'acide lactique 1 gr. 04 par litre.

TABLEAU XVI

Acidité fixe formée exprimée en acide lactique, gr. par litre	1 gr. 04
Acidité volatile formée exprimée en acide acétique, gr. par litre	0 gr. 78

Dans la deuxième série d'expériences, nous nous sommes servis de milieux de culture plus concentrés en sucre, 1 gr. 651 p. 100.

En treize jours, la fermentation est achevée. Sur 1 gr. 651 de sucre offert, 97,3 p. 100 sont consommés. La production d'acide s'élève à 5 gr. 4 par litre calculé en acide acétique. C'est un mélange d'acide acétique et d'acide lactique qui se produit dans ces conditions. La quantité d'acide acétique produite est de 2 gr. par litre et celle de l'acide lactique est de 2 gr. 74 par litre. Dans la fermentation du fructose, en milieu acide, la production d'alcool est minime, 9 mgr. seulement pour 100 cmc. de milieu. Ce qui est caractéristique, c'est la production du mannitol. 68 gr. 4 p. 100 de fructose consommés se sont transformés en mannitol, c'est-à-dire 1 gr. 608 de fructose ont fourni 1 gr. 1 de mannitol. Le tableau XVII résume les résultats obtenus.

TABEAU XVII

DURÉE EN JOURS	FRUCTOSE RES- TANT EN GR. % CC. DU LIQUIDE DE CULTURE	FRUCTOSE CON- SOMMÉ EN GR. % CC. DU LIQUIDE DE CULTURE	FRUCTOSE CONS. % DU FRUCTOSE OFFERT	ACIDITÉ FORMÉE EXPRIM. EN AC. ACÉTIQUE GR. PAR LITRE (par titration)	POUR 100 CC, ALCOOL EN MGR.	ROTATION (1 = 2)
0	1,651	0	0	pH 6,4	0	— 2°90
3	0,751	0,90	54,3	2	5,8	— 1°4
5	0,49	1,16	70	2,58	5,3	— 0°60
8	0,178	1,47	89	3,2	9,3	0°
13	0,043	1,608	97,3	3,42	»	+ 0°26

TABEAU XVIII

Acidité totale formée exprimée en acide acétique, gr. par litre	5 gr. 4
Acidité fixe effectivement formée et exprimée en acide lactique, gr. par litre	2 gr. 72
Acidité volatile effectivement formée et exprimée en acide acétique, gr. par litre	2 gr.
Mannitol formé	1 gr. 1
Mannitol formé % du fructose consommé.	68 gr. 4

Ainsi, la fermentation du fructose dans le milieu acide est caractérisée, avant tout, par la production de mannitol en quantités massives et ensuite par la production d'une quantité d'acide lactique qui est supérieure à celle de l'acide acétique.

B) *La marche de la fermentation dans le milieu maintenu neutre*

Dans la première expérience, en milieu neutre, nous nous sommes servis du milieu de culture contenant 3 gr. 69 de fructose.

En douze jours de fermentation, 79 gr. 4 p. 100 du fructose offert sont consommés. Ce qui est caractéristique dans cette fermentation, c'est la modification profonde dans la nature des acides formés ou, plus exactement, des acides qu'on trouve à la fin de l'opération. Dans le milieu acide, c'est l'acide lactique qui prédomine, alors que c'est l'inverse qui se produit dans le milieu maintenu neutre. En effet, dans la deuxième expérience en milieu acide, il s'est formé 2 gr. 72 d'acide lactique, tandis que la quantité d'acide acétique produit arrivait à 2 gr. par litre. Dans la fermentation en milieu neutre, au contraire, c'est l'acide acétique qui se produit en quantité plus élevée. Ainsi que le montre le tableau XIX, la quantité formée atteint 5 gr. 4 par litre pour 2 gr. d'acide lactique seulement.

La production de l'alcool est toujours moins grande que dans la fermentation des autres sucres examinés jusqu'ici. Voici les résultats obtenus :

TABLEAU XIX

DURÉE EN JOURS	FRUCTOSE RES- TANT EN GR. % CC. DU LIQUIDE DE CULTURE	FRUCTOSE CON- SOMMÉ EN GR. % CC. DU LIQUIDE DE CULTURE	FRUCTOSE CONS. % DU FRUCTOSE OFFERT	ACIDITÉ FORMÉE EXPRIMÉE EN AC. ACÉTIQUE GR. PAR LITRE (par titration)	POUR 100 CC. ALCOOL EN MGR.	ROTATION (1 = 2 dm)
0	3,69	0	0	pH = 6,4	0	— 7°66
2	3,39	0,30	8,2	0,9	2,33	— 6°02
5	2,05	1,64	44,4	2,08	4,26	— 4°72
7	2,10	1,58	43	2,0	12	»
9	1,67	2,0	54,5	5,0	8,4	— 3°6
12	0,74	2,95	79,4	6,8	8	— 1°72

TABLEAU XX

Acidité totale formée exprimée en acide acétique, gr. par litre	6 gr. 8
Acidité fixe formée exprimée en acide lactique, gr. par litre	2 gr. 05
Acidité volatile formée exprimée en acide acétique, gr. par litre	5 gr. 4

La deuxième série d'expériences en milieu neutre a porté sur une solution contenant 4 gr. 71 p. 100 de fructose. Dans cette expérience, sur les 4 gr. 71 de fructose offert, la presque totalité est consommée, soit 98,89 p. 100. Ici aussi, on constate le fait signalé de la modification dans la nature des acides formés. L'acide acétique domine toujours de loin l'acide lactique : 5 gr. 6 par litre d'acide acétique pour 1 gr. 09 d'acide lactique.

76 p. 100 du fructose se transforment en mannitol.

0 gr. 5 de glycérol prennent naissance dans cette fermentation.

Le tableau XXI montre les chiffres obtenus dans ces expériences.

TABLEAU XXI

DURÉE EN JOURS	FRUCTOSE RESTANT EN GR. % CC. DU LIQUIDE DE CULTURE	FRUCTOSE CONSOMMÉ EN GR. % CC. DU LIQUIDE DE CULTURE	FRUCTOSE CONS. % DU FRUCTOSE OFFERT	ACIDITÉ VOLATILE FORMÉE EXPRI- MÉE EN AC. ACÉ- TIQUE GR. PAR LITRE (par titration)	ACIDITÉ FORMÉE FIXE EXPR. EN AC. LACT.	POUR 100 CC. ALCOOL EN MGR.	ROTATION (1 = 2)
0	4,71	0	0	pH = 6,7		0	— 8°4
2	3,00	1,71	36,3	0,350	—	11,3	— 5°1
4	1,033	3,68	78	0,45	—	»	— 1°38
7	0,39	4,32	91,7	5,4 vol.	0,9	15	— 0°15
11	0,06	4,65	97,8	5,6 vol.	1	»	»
23	0,057	4,65	98,7	5,6 vol.	1,09	»	0°

40 L'ACTION DU FERMENT MANNITIQUE SUR QUELQUES DIHOLOSIDES

Nous avons enfin effectué quelques expériences portant sur les diholosides suivants : saccharose, maltose et lactose.

Saccharose: Le ferment mannitique de Gayon et Dubourg n'agit aucunement sur le saccharose si l'on ajoute le sucre au milieu dans des conditions qui permettent d'éviter toute hydrolyse préalable.

Maltose et lactose: Le ferment mannitique n'a aucune action sur ces sucres, mais il fait fermenter le lactose préalablement hydrolysé. Dans ce cas, cependant, il n'y a point production de mannitol. Ni le glucose, ni le galactose ne donnent lieu à la production de ce polyalcool. Les indications contraires qu'on trouve chez divers auteurs semblent être dues au fait que l'on n'a pas suffisamment fait attention à la réaction du milieu, reproche qu'on peut adresser même à Gayon et Dubourg.

QUATRIÈME PARTIE

LA FERMENTATION MANNITIQUE ET LA RÉDUCTIBILITÉ DES MILIEUX

Dans ce qui précède il a été montré que les fonctions du ferment mannitique peuvent être modifiées ; cette modification est due aux changements, qu'on apporte à la nature de la réaction du milieu, dans lequel ce ferment évolue.

Le ferment mannitique ne fait, ainsi, point exception à la règle qui a été observée chez tout micro-organisme tel que la levure, les ferments butyriques et acétonobutyliques, faits déjà mentionnés. Ici même, suivant la réaction du milieu, le ferment mannitique figure en agissant sur le glucose, tantôt comme ferment producteur d'acide lactique (milieu neutre), tantôt comme producteur d'acide acétique (milieu acide).

Or, les propriétés acidogènes de ce même ferment changent lorsqu'on le fait vivre sur le fructose. Dans ce dernier cas, c'est dans le milieu acide que se produit un excès d'acide lactique, alors que c'est le milieu maintenu neutre qui fournit un excédent d'acide acétique. Mais ce qui caractérise tout particulièrement le ferment de Gayon et Dubourg, c'est, on l'a déjà dit, le fait que seul le fructose est réduit, est transformé en mannitol, alors que l'hydrogène formé au cours de la fermentation n'est pas fixé sur le glucose.

Cet état de choses est-il dû à la structure moléculaire

du fructose ? Est-ce la nature aldéhydique du glucose qui l'empêche de fixer l'hydrogène ? Ou bien faut-il invoquer la réductibilité différente des milieux contenant ces sucres ?

C'est cette dernière question que nous avons voulu aborder en premier lieu. A cet effet, nous avons essayé de mesurer la réductibilité des milieux sur lesquels ont porté nos essais ; et nous avons eu recours aux mesures du rH_2 par voie colorimétrique, suivant la méthode habituelle telle qu'elle est décrite dans le livre *Oxydation et réduction* de René Wurmser (58) Rappelons, d'autre part, que la réductibilité de différents milieux et de solutions sucrées a été mise à l'épreuve dans ces dernières années. Nous devons les recherches les plus importantes dans ces domaines à E. Aubel et à ses collaborateurs. Ainsi, E. Aubel, Aubertin et Mauriac (59) ont déterminé le potentiel d'oxydo-réduction des cellules de mammifères. E. Aubel, E. Aubertin, L. Genevois ont déterminé le potentiel d'oxydo-réduction de la levure, des anaérobies facultatifs, des anaérobies stricts et des milieux où vivent ces micro-organismes (60). La détermination de ce même potentiel dans la levure, le *B. coli* et les milieux où vivent ces micro-organismes, a été effectuée par E. Aubel et L. Genevois (61). Un autre travail

(58) R. WURMSER : Oxydation et réduction. *Les Problèmes Biologiques*. Collection de Monographies publiées sous le patronage du comité technique des Sciences Naturelles des Presses Universitaires de France, XV, 1930.

(59) E. AUBEL, E. AUBERTIN, P. MAURIAC : Sur le potentiel d'oxydo-réduction des cellules de mammifères. *C. R. Soc. de biol.*, t. **98**, 1928, p. 589.

(60) E. AUBEL, E. AUBERTIN, L. GENEVOIS : Sur le potentiel d'oxydo-réduction de la levure, des anaérobies facultatifs, des anaérobies strictes et des milieux où vivent ces micro-organismes. *Ann. Physiol. et Physicochim. Bio.*, t. **5**, 1929, p. 1.

(61) E. AUBEL, L. GENEVOIS : Sur le potentiel d'oxydo-réduction de la levure, du *B. coli* et des milieux où croissent ces micro-organismes. *C. R. Ac. Sc.* t. **184**, 1927, p. 1676.

a été effectué par E. Aubel et R. Lévy pour déterminer le potentiel d'oxydo-réduction (62) dans les chenilles de *Galleria mellonella*. Les potentiels des solutions sucrées ont été mesurés par E. Aubel, L. Genevois et R. Wurmser (63). Le potentiel d'une électrode de platine platinée au contact d'une solution de glucose a été mesuré par E. Aubel et R. Wurmser (64).

Les résultats de nos expériences sont enregistrés ci-dessous :

TABEAU XXII

LES RÉACTIFS	rH ₂	FRUCTOSE		GLUCOSE
Rouge neutre . . .	2,3	Red.	Réduit à 80° en 15'	Non Red.
Vert janus . . .	5,3	Red.		»
Phénosafranine. . .	5,7	Red.		»
Violet de crésyle . .	8,3	Red.		»
Bleu de Nil . . .	9,2	Red.		»
Disulfonate d'indigo.	9,9	Red.	Réduit	»
Trisulfonate d'indigo	11,3	Red.		»
Tétrasulfonate d'indigo.	12,5	Red.		»
Bleu de crésyle. . .	15,1	Red.		»

Les colorants ayant un $rH_2 = 12,5$, c'est-à-dire jusqu'au bleu de crésyle exclu, ne sont pas réduits par le milieu glucosé, tandis que le milieu additionné de fructose réduit à froid tous les colorants à partir du disulfonate d'indigo. Cette expérience simple montre que le rH_2 de la solution glucosée est bien plus élevé que celui de la solution contenant le fructose. Une

(62) E. AUBEL, R. LÉVY : Le potentiel d'oxydo-réduction dans les chenilles de *Galleria mellonella*. *C. R. Soc. Biol.*, t. **101**, 1929, p. 756.

(63) E. AUBEL, L. GENEVOIS, R. WURMSER : Sur le potentiel apparent des solutions de sucres réducteurs. *C. R. Ac. Sc.*, t. **184**, 1927, p. 407.

(64) E. AUBEL, R. WURMSER : Sur le potentiel d'une électrode de platine platinée au contact d'une solution de glucose et sa signification en biochimie, *Ann. Chimie physique*, t. **26**, 1929, p. 229.

expérience faite à 40° a confirmé pleinement cette première observation.

Dans une autre série, faite exactement de la même façon, nous avons effectué ces expériences à haute température (voir le tableau XXII).

A 80°, le fructose réduit toutes les matières colorantes en quinze minutes, tandis que le glucose reste inactif vis-à-vis des colorants ayant un rH_2 inférieur à 9,9. Cette expérience, qui a été répétée trois fois, a donné constamment les mêmes résultats.

On voit aussi que le fructose communique au milieu de culture un pouvoir réducteur, un rH_2 au-dessous de 2, 3, alors que le glucose ne lui communique qu'un pouvoir réducteur beaucoup plus faible et qui correspond à une tension d'hydrogène de $rH_2 = 11,3$.

Il semble alors que l'incapacité du ferment mannitique à réduire le glucose pourrait être due tout simplement au fait que le milieu contenant ce sucre ne possède point la tension d'hydrogène nécessaire pour que la réduction puisse avoir lieu.

Il résulte de cette constatation que le pouvoir réducteur du milieu de culture est une condition nécessaire pour la manifestation de la spécificité mannitique du ferment mannitique de Gayon et Dubourg.

Une fois ce fait constaté, on pourrait se demander s'il est possible de transformer le glucose en mannitol en changeant le rH_2 du milieu de culture, en augmentant sa tension d'hydrogène.

Une série d'expériences a été effectuée dans ce but et voici les résultats obtenus :

ESSAIS EN VUE DE DIMINUER LE rH_2
DU MILIEU DE CULTURE

1° On sait que le potentiel E_H d'une électrode de platine plongée dans une solution contenant des ions H^+ et dans une atmosphère d'hydrogène dont l'activité est $[H_2]$, s'exprime par la formule :

$$E_H = - \frac{1}{0,4343} \times \frac{RT}{F} \text{pH} - \frac{1}{0,4343} \times \frac{RT}{2F} \times \log. [H_2]$$

c'est-à-dire que le rH_2 dépend du pH du milieu de culture.

Ainsi, on peut arriver à diminuer le rH_2 du milieu en changeant la réaction du milieu.

$$\text{pH} = \frac{rH_2}{2} - \frac{E_H}{\frac{1}{0,4343} \times \frac{RT}{F}}$$

Pour atteindre, par cette méthode, un rH_2 suffisamment bas, c'est-à-dire au-dessous de 2, 3, tel qu'on le trouve dans une solution de fructose, il faut augmenter l'alcalinité du milieu jusqu'à un pH supérieur à 11 (voir Wurmser : *Oxydation et réduction*, p. 288).

Peu d'êtres vivants vivent alors dans cette alcalinité.

Néanmoins, nous avons essayé d'établir l'alcalinité limite compatible avec la vie du ferment de Gayon et Dubourg. A cet effet, nous avons préparé une série de milieux de culture dont le pH allait en augmentant de $\text{pH} = 6,7$ à $\text{pH} = 10$.

Ces essais ont fait voir que notre ferment peut se développer seulement dans le milieu ayant un pH inférieur à 8,4.

Les essais faits en vue d'acclimater le ferment à des pH plus élevés n'ont pas abouti.

Le développement du ferment s'arrête à un pH 8, 6. Aucun développement n'est plus possible à partir de ce pH, même après 10 ou 20 passages sur un milieu ayant un pH 8,2. On peut donc considérer que le pH maximum de croissance du ferment mannitique est situé à 8,6.

Ce fait, une fois bien établi, il est devenu superflu d'aller plus loin et d'essayer de modifier le rH_2 du milieu par simple changement du pH.

2° *L'essai par l'hydrosulfite.* — Parmi les réactifs réducteurs qui peuvent augmenter la réductibilité du milieu, on peut recourir à l'hydrosulfite de sodium, qui est, on le sait, un très puissant réducteur.

Nous avons employé une solution centième normale. Mais, dans une pareille solution, le ferment mannitique ne se développe point.

En effet, l'hydrosulfite de sodium agit comme un antiseptique, même avec une dose de 0 gr. 174 par litre. Ce réactif a donc dû être éliminé à son tour.

3° *L'essai par la mousse de platine.* — La mousse de platine est un très puissant réducteur. Elle a été employée par Plotz et Geloso (65) dans leurs études sur le rôle du rH_2 dans la culture des anaérobies. Nous avons tenté de nous en servir à notre tour en vue de diminuer le rH_2 du milieu de culture. A cet effet, nous avons préparé deux flacons contenant chacun 400 cmc. d'eau de levure glucosée à 4 p. 100. Nous y ajoutons 20 cmc. de lait de craie stérile pour maintenir le milieu neutre pendant toute la fermentation. L'ensemencement est

(65) PLOTZ et GELOSO : Relation entre la croissance des micro-organismes anaérobies et le potentiel du milieu de culture. *Annales de l'Institut Pasteur*, t. 45, 1930, p. 613.

effectué avec une culture fraîche de vingt-quatre heures. Douze heures après, quand la fermentation était en pleine marche, nous y avons introduit de la mousse de platine. En présence de mousse de platine, la fermentation ne s'arrête pas. Grâce à la présence de la craie, tout le sucre offert est presque complètement consommé.

Pendant toute la durée de la fermentation, la réaction est maintenue constante par la présence de la craie ; la réductibilité du milieu reste inchangée, c'est-à-dire que le rH_2 reste fixe.

Ceci résulte des essais, dans lesquels nous avons prélevé une certaine quantité de liquide en fermentation et débarrassé de tout être vivant, par filtration. Ce liquide réduit tous les colorants que nous avons indiqués dans le tableau XXII.

En poursuivant la fermentation, nous avons effectué deux essais à trois jours d'intervalle, en vue de connaître l'évolution du milieu fermenté au point de vue de sa puissance réductrice. Nous avons obtenu toujours les mêmes résultats, c'est-à-dire que le milieu conservait toujours son pouvoir réducteur nouvellement acquis, pendant toute la durée de la fermentation. Vers la fin, le liquide fermenté avait le même rH_2 qu'au début de la fermentation.

La présence de la mousse de platine dans un milieu de culture lui communique ainsi une réductibilité qui se rapproche de celle d'un milieu additionné de fructose.

Si la production du mannitol aux dépens du fructose était due uniquement à la réductibilité particulièrement basse des solutions, on devrait obtenir du mannitol dans un milieu glucosé dont le rH_2 est abaissé artificiellement par l'addition de mousse de platine. Or il n'en est rien. Les quatre expériences spéciales entreprises dans ce but n'ont pas donné le résultat

attendu. Dans aucun cas nous n'avons pu mettre en évidence la production de mannitol.

4^o *Essais par le sulfite de calcium.* — Une autre série d'essais a été effectuée, dans laquelle la diminution du rH_2 a été obtenue par l'addition de sulfite de calcium.

Lorsqu'on ensemence un milieu de culture constitué par de l'eau de levure glucosée à 5 p. 100 et additionné d'une émulsion de sulfite de calcium, la fermentation reprend, mais au bout de trois jours, elle s'arrête. L'acide sulfureux provenant de l'action des acides produits par la fermentation du glucose sur le sulfite de calcium tue les ferments mannitiques. Pour pouvoir acclimater plus ou moins le ferment mannitique à l'acide sulfureux, nous l'avons fait se développer en présence de sulfite de calcium dans des tubes de centrifugeuse préalablement stérilisés. Et tous les trois jours, après avoir centrifugé le contenu des tubes, nous avons retiré aseptiquement le jus fermenté. Nous y avons ajouté de nouveau le bouillon frais. Ainsi, en présence d'une grande quantité de cellules, la fermentation reprend. Après sept passages, nous avons pu obtenir des cellules qui ont pu fermenter jusqu'à 25 p. 100 du sucre offert. Dès ce moment, l'augmentation de l'acide sulfureux dans le milieu empêche la fermentation et tue le ferment mannitique, avant même une semaine.

Bien que le jus ainsi fermenté réduise le rouge neutre, c'est-à-dire qu'il présente un rH_2 au-dessous de 2, 3, nous n'avons pu déceler, dans ces milieux, aucune trace de mannitol formé, et cela, ni par l'extraction à l'alcool, ni par la méthode au benzaldéhyde.

ESSAIS DE FERMENTATION DU SORBOSE

1° Fermentation du sorbose seul

On voit que la simple diminution du rH_2 des milieux de culture, c'est-à-dire l'augmentation de la puissance réductrice des milieux de culture, ne suffit point pour imposer au ferment étudié la spécificité mannitique vis-à-vis du glucose.

Est-ce alors la seule fonction cétonique du fructose qui serait responsable de la fonction mannitique du ferment de Gayon et Dubourg ? Pour vérifier cette possibilité, nous avons effectué une nouvelle série d'expériences dont voici les principaux résultats :

On sait que les hexoses cétoniques, à part le fructose, sont très rares et difficilement accessibles. Seul, le sorbose peut être obtenu aisément, grâce à la méthode bien connue de Gabriel Bertrand (66) ; pour préparer ce sucre cétonique, nous nous sommes adressés au sorbitol du commerce, le sionon. Ce produit a été transformé par la bactérie du sorbose en sorbose, suivant les indications de G. Bertrand, et le sorbose obtenu a été cristallisé deux fois en vue de sa purification.

Le sorbose ainsi préparé et purifié a été soumis à l'action du ferment mannitique dans les mêmes conditions que le fructose. Or, la première difficulté à laquelle on se heurte, c'est que l'arrangement stéréochimique moléculaire du sorbose le classe parmi les sucres non fermentescibles.

(66) Gabriel BERTRAND. Étude biochimique de la bactérie du sorbose. *Ann. Chim. et Phys.* [8^e série], t. 3, 1904, p. 181.

Le ferment mannitique de Gayon et Dubourg mène, en effet, une existence extrêmement pénible dans un milieu où il ne trouve comme matière glucidique que le sorbose.

Nous avons essayé, cependant, d'acclimater le ferment à ce sucre, à l'instar de ce qui a été fait à propos du galactose en vue d'acclimater ce sucre aldéhydique à la fermentation par la levure. Trente passages à trois jours d'intervalle, ont été effectués dans ce but sans résultat appréciable.

Le tableau XXIII montre les chiffres obtenus dans une expérience faite avec un milieu de culture contenant 1 p. 100 environ de sorbose en milieu acide.

TABLEAU XXIII

DURÉE EN JOURS	SORBOSE INITIAL ET RESTANT % CC. DU LIQUIDE DE CULTURE	SORBOSE CONSOM- MÉ % CC. DU LIQUIDE DE CULTURE	SORBOSE CON- SOMMÉ % DU SOR- BOSE INITIAL
0	0,9285	0	0
7	0,862	0,026	3
12	»	»	»
16	»	»	»

Des 0 gr. 928 p. 100 de sorbose offert, le ferment mannitique ne peut consommer que 26 mgr., pendant une durée de cinq jours. D'ailleurs, dans le milieuensemencé, on ne voit aucun changement apparent qui caractérise une fermentation. Cet aspect est le même, aussi bien dans la fermentation effectuée en grande quantité avec 400 cmc., tel que dans le cas de l'expérience ci-dessus, que dans les tubes contenant 15 cmc. de milieu sorbosé.

Dans deux autres expériences effectuées dans les mêmes conditions, seules les concentrations en sor-

bose étaient plus élevées (1 gr. 51 p. 100 et 2 gr. 65 p. 100); les résultats ne furent pas plus heureux. Dans ces conditions, 26 ou 30 mgr. de sorbose seulement ont disparu.

2° Fermentation simultanée du sorbose et du glucose.

Ces résultats négatifs nous ont conduits à opérer d'une façon différente. Nous avons pensé que, si le sorbose se trouve dans un milieu où le ferment mannitique peut accomplir avec rigueur ses fonctions fermentatives aux dépens d'un sucre fermentescible, le sucre cétonique pourrait être entraîné et, par conséquent, fermenter à son tour.

Ainsi, nous avons préparé des milieux de culture ayant une concentration en levure desséchée deux fois plus élevée que dans toutes nos autres expériences faites jusqu'ici. Nous avons pris cette précaution pour offrir au ferment un milieu aussi riche que possible. Et, comme sucre fermentescible, nous avons choisi le glucose qui, lui-même, ne donne aucunement naissance, sous l'action du ferment mannitique, au mannitol. Le tableau XXIV montre les chiffres obtenus dans cette expérience (1).

Dans ces 400 cmc. de milieu de culture qui contiennent 0 gr. 8 de sorbose et 0 gr. 792 de glucose pour 100 cmc., la fermentation s'achève au bout de cinq jours; lorsque 88,1 p. 100 de glucose offert ont disparu, la quantité des sucres restants ne varie plus.

Au cours des cinq jours de fermentation, le glucose disparaît sous l'action du ferment; en même temps, une partie du sorbose, comme le montre le tableau ci-dessus, est entraînée à son tour. En effet, sur 0 gr. 8

(1) Nous avons dosé le glucose par iodométrie et le sucre réducteur total est dosé par la méthode de G. Bertrand. Ce mode opératoire permet de doser séparément le glucose et le sorbose.

TABLEAU XXIV

DURÉE EN JOURS	SORBOSE RES- TANT EN GR. % CC. DU LIQUIDE DE CULTURE	SORBOSE CONS. EN GR. % CC. DU LIQUIDE DE CUL- TURE	SORBOSE CONS. % DU SORBOSE OFFERT	GLUCOSE RES- TANT EN GR. % CC. DU LIQUIDE DE CULTURE	GLUCOSE CONS. % DU GLUCOSE OFFERT
0	0,80	—	—	0,792	—
13	0,55	0,25	30,1	0,092	88,1
20	»	»	»	»	»
30	»	»	»	»	»

du sorbose offert 0 gr. 25 c'est-à-dire 30,1 p. 100, fermentent en même temps que le glucose.

Cette expérience nous a permis de constater que le sorbose peut être fermenté, lorsqu'il est accompagné par un autre sucre fermentescible. D'autre part, une fois le sucre aldéhydique fermentescible disparu, la fermentation s'arrête et avec elle la consommation du sorbose. D'ailleurs l'augmentation de l'acidité dans le milieu gêne l'action du ferment.

Dans une autre série d'expériences, nous avons changé les proportions entre le sorbose et le glucose. Dans deux expériences les rapports entre le glucose et le sorbose, au lieu d'être comme précédemment $\frac{1}{1}$ sont $\frac{0 \text{ gr. 5 sorbose p. 100}}{1,50 \text{ glucose}}$ dans l'une, $\frac{0,75 \text{ sorbose p. 100}}{1,25 \text{ glucose}}$ dans l'autre.

Les tableaux XXV et XXVI représentent les chiffres que l'analyse a donnés.

Les tableaux XXV et XXVI montrent que le changement du rapport entre la quantité de sorbose et la quantité de glucose ne modifie guère la marche de la fermentation ; l'augmentation de la quantité du glucose par rapport au sorbose n'entraîne nullement

TABLEAU XXV

DURÉE EN JOURS	SORBOSE RES- TANT EN GR. % CC. DU LIQUIDE DE CULTURE	SORBOSE CONS. EN GR. % CC. DU LIQUIDE DE CUL- TURE	SORBOSE CONS. % DU SORBOSE OFFERT	GLUCOSE RES- TANT EN GR. % CC. DU LIQUIDE DE CULTURE	GLUCOSE CONS. % DU GLUCOSE OFFERT
0	0,751	0	0	1,27	0
8	0,487	0,244	32,4	0,14	88
12	»	»	»	»	»
20	»	»	»	»	»

TABLEAU XXVI

DURÉE EN JOURS	SORBOSE RES- TANT EN GR. % CC. DU LIQUIDE DE CULTURE	SORBOSE CONS. EN GR. % CC. DU LIQUIDE DE CUL- TURE	SORBOSE CONS. % DU SORBOSE OFFERT	GLUCOSE RES- TANT EN GR. % CC. DU LIQUIDE DE CULTURE	GLUCOSE CONS. % DU GLUCOSE OFFERT
0	0,52	»	0	1,58	0
6	0,367	0,157	30,5	0,40	74,6
12	»	»	»	»	»
18	»	»	»	»	»

une augmentation de la quantité de sorbose fermenté. Tandis que dans la première expérience (tableau XXIII) 0 gr. 25 p. 100 de sorbose sont consommés, dans ces deux dernières expériences le sorbose consommé est de l'ordre de 0 gr. 157 à 0 gr. 244.

L'augmentation de la quantité de glucose ne fait qu'entraîner l'accroissement de la production d'acide et, par conséquent, entrave la marche même de la fermentation.

Les chiffres consignés dans le tableau XXV montrent ceci d'une façon évidente. Dans cette expérience la

quantité de glucose, c'est-à-dire 1 gr. 5, est plus élevée que dans l'expérience précédente : par conséquent, l'acidité produite dans cette fermentation est plus grande. D'autres part, dans ce cas : 0 gr. 157 de sorbose ont été fermentés au lieu de 0 gr. 244 comme dans l'expérience précédente.

Les chiffres qui précèdent se rapprochent de ceux qui correspondent aux essais de fermentation effectués en milieu acide. Il était indispensable de répéter ces expériences en maintenant le milieu neutre par l'addition de craie. Dans ces expériences, en outre, le taux du glucose a été augmenté. Voici les résultats obtenus :

TABLEAU XXVII

DURÉE EN JOURS	SORBOSE RES- TANT EN GR. % CC. DU LIQUIDE DE CULTURE	SORBOSE CONS. EN GR. % CC. DU LIQUIDE DE CUL- TURE	SORBOSE CONS. % DU SORBOSE OFFERT	GLUCOSE RES- TANT EN GR. % CC. DU LIQUIDE DE CULTURE	GLUCOSE CONS. % DU GLUCOSE OFFERT
0	0,928	0	0	3,024	0
4	0,659	0,269	29	0,703	76,7
8	0,645	0,283	30,5	0,006	99,8
12	»	»	»	»	»

TABLEAU XXVIII

DURÉE EN JOURS	SORBOSE RES- TANT EN GR. % CC. DU LIQUIDE DE CULTURE	SORBOSE CONS. EN GR. % CC. DU LIQUIDE DE CUL- TURE	SORBOSE CONS. % DU SORBOSE OFFERT	GLUCOSE RES- TANT EN GR. % CC. DU LIQUIDE DE CULTURE	GLUCOSE CONS. % DU GLUCOSE OFFERT
0	0,928	0	0	3,024	0
5	0,571	0,357	38,4	0,0036	99,9
8	»	»	»	»	»
12	»	»	»	»	»

Les tableaux XXVII et XXVIII montrent la marche de la disparition du glucose entraînant avec lui le sorbose dans la fermentation. Dans cette expérience, la consommation du sorbose n'est pas aussi élevée, comme on pourrait s'y attendre. De 0 gr. 9281 p. 100 de sorbose offert, 0 gr. 287 p. 100 sont consommés dans la première expérience, dans la deuxième 0 gr. 357, avec un excès de 0 gr. 069 p. 100.

Ces deux dernières séries d'expériences montrent que le ferment mannitique agit toujours de la même façon, lorsqu'il se trouve en présence de sorbose. Quelle que soit la réaction du milieu, la fermentation du sorbose dépend uniquement de la présence du glucose. Une fois le glucose disparu du milieu, la fermentation s'arrête aussitôt, bien qu'il reste encore du sorbose non attaqué.

Nous nous sommes astreints à la recherche du sorbitol, dans le milieu dont le sorbose disparaît, lorsque ce sucre cétonique est fermenté en présence du glucose.

Soit dans le milieu acide ou neutre, soit dans des milieux glucosés ou non, lorsqu'on veut caractériser le sorbitol par l'extraction à l'alcool, on arrive à des résultats négatifs, c'est-à-dire qu'on ne trouve aucune trace, ni de sorbitol, ni de mannitol.

Tous les essais faits après chaque expérience nous ont démontré l'insuffisance de cette méthode. En présence de ce fait, nous nous sommes décidés à employer la méthode de condensation, méthode permettant la caractérisation du sorbitol et qui consiste à combiner cet alcool avec le benzaldéhyde (voir page 32).

Dans les expériences faites en milieu acide avec 400 cmc. de milieu, lorsqu'on se sert de cette méthode avec toutes les précautions qu'on vient de citer au chapitre II, on obtient quelques cristaux soyeux, très bien formés, ayant un aspect de paillettes blanches.

Dans le milieu alcalin, on en obtient une quantité beaucoup plus élevée, quantité suffisante pour être pesée.

Lorsqu'on détermine le point de fusion de ces cristaux, que nous supposons être du dibenzaldéhydesorbitol, on voit avec étonnement que ces cristaux fondent à 220°, c'est-à-dire à la température de fusion du tribenzaldéhydemannitol.

Ainsi, on pourrait penser que le sorbose, qui est un sucre cétonique non fermentescible, s'il fermente sous l'action du ferment mannitique, devrait se transformer logiquement, comme son isomère, le fructose, en son alcool correspondant, c'est-à-dire en sorbitol.

Mais cette supposition est démentie par le fait expérimental. Reste à savoir si le sorbose, au cours de son attaque par le ferment mannitique, ne subit pas une transposition intramoléculaire qui le rend apte à fournir du mannitol. Cette transformation est-elle accompagnée d'une mobilisation de l'hydrogène du groupement alcool secondaire autour du quatrième atome de carbone ?

C'est cette question qui nous a conduit à mesurer le rH_2 d'un milieu constitué par du sorbose et de l'eau de levure.

Lorsqu'on mesure, avec toutes les précautions nécessaires, le rH_2 du milieu contenant ce sucre cétonique, on voit tout de suite qu'il s'agit d'un sucre moins réducteur que le fructose, c'est-à-dire qu'il fournit des solutions ayant un rH_2 supérieur à celui des solutions de fructose.

Ainsi, dans une expérience, nous avons pu constater que le milieu contenant du sorbose réduisait toutes les matières colorantes ayant un rH_2 au-dessus de 9,2 (tableau XXII) à 80° en quinze minutes. Mais tous les autres colorants qui ont un rH_2 inférieur à ce chiffre restent non réduits.

Peut-on attribuer la non fermentescibilité du sorbose à ce fait ?

FERMENTATION DU SORBOSE EN PRÉSENCE DE CYSTÉINE

Pour répondre à cette question, nous avons tâché de diminuer le rH_2 du milieu sorbosé au moyen de réactifs réducteurs.

En présence de sulfite de calcium, le sorbose reste non fermentescible, puisque la présence de l'acide sulfureux dans le milieu dépend, en premier lieu, de l'acidité produite dans la fermentation, c'est donc que ce réactif ne peut pas servir à cet effet.

Il nous a fallu chercher un réactif qui soit puissamment réducteur et ne gêne en aucune façon la fermentation. La cystéine remplit ces conditions.

Lorsqu'on met 20 cmc. d'une solution $\frac{N}{1.000}$ de cystéine (1) dans 80 cmc. d'un milieu sorbosé et qu'on mesure son rH_2 , on voit que le milieu devient plus réducteur et il réduit toutes les matières colorantes du tableau XXII. On peut donc espérer que la diminution du rH_2 du milieu de culture par la cystéine va faciliter la fermentation du sorbose. En effet, lorsqu'on ensemence 100 cmc. de milieu sorbosé contenant 20 cmc. d'une solution $\frac{N}{1.000}$ de cystéine, la fermentation se déclenche avec une vitesse beaucoup plus grande que dans le milieu qui ne renferme pas de cystéine. Toutefois, si pendant les premières heures de la fermentation la réductibilité du milieu conserve sa valeur initiale,

(1) La cystéine n'est soluble qu'à l'état de chlorhydrate. Il faut la neutraliser avec la soude. A pH 7 environ, elle peut rester à l'état de suspension pendant quelques heures, si l'on laisse plus d'une nuit, elle se précipite. Nous l'avons ajoutée à nos expériences tout de suite après la stérilisation ; dans ce cas, elle ne précipite pas.

au fur et à mesure que la cystéine disparaît du milieu, la réductibilité diminue et en douze heures le milieu ne donne plus ni la réaction de HgCl_2 , ni la réaction au nitroprussiate de sodium, qui caractérisent la présence de la cystéine. A partir de ce moment, la fermentation s'arrête pour ne plus recommencer et la réductibilité du milieu diminue et atteint sa valeur initiale, c'est-à-dire un rH_2 supérieur à 9,2.

Le tableau ci-dessous contient les chiffres obtenus dans une de ces expériences que nous avons effectuées dans les conditions qui viennent d'être indiquées.

Des 1 gr. 916 de sorbose offert, seulement 3 mgr. 6 de sorbose ont été consommés dans les vingt-quatre heures; les jours suivants, la fermentation s'est arrêtée complètement.

TABEAU XXIX

DURÉE EN JOURS	SORBOSE RESTANT EN GR. % CC. DU LIQUIDE DE CULTURE	SORBOSE CONSOMMÉ EN GR. % CC. DU LIQUIDE DE CULTURE	SORBOSE CONSOMMÉ % DU SORBOSE OFFERT
0	1,916	0	0
1	1,88	% 0,036	1,8
2	»	»	»
5	»	»	»

Pour rendre le milieu plus favorable à l'action du ferment mannitique nous avons préparé un milieu sorbosé contenant du glucose, et nous y avons ajouté 20 cmc. d'une solution de cystéine $\frac{\text{N}}{200}$, cinq fois plus concentrée que dans les expériences précédentes. Cette expérience fut effectuée en présence de craie.

Les chiffres obtenus dans cette expérience sont consignés dans le tableau ci-après :

TABLEAU XXX

DURÉE EN JOURS	SORBOSE RESTANT EN GR. % CC. DU LIQUIDE DE CULTURE	SORBOSE CONSOMMÉ EN GR. % CC. DU LIQUIDE DE CULTURE	SORBOSE CONSOMMÉ % DU SORBOSE OFFERT	GLUCOSE RESTANT EN GR. % CC. DU LIQUIDE DE CULTURE	GLUCOSE CONSOMMÉ % DU GLUCOSE OFFERT
0	1,239	0	0	1,633	0
2	0,950	0,289	23,4	0,372	77
6	0,908	0,321	26,71	0,193	90
10	»	»	»	»	»
14	»	»	»	»	»

Ce qui frappe l'attention dans cette expérience c'est la vitesse avec laquelle les sucres ont disparu.

En présence de cystéine les sucres fermentent donc avec une vitesse plus grande qu'en l'absence de cet acide aminé. Ainsi, en deux jours, sur 1 gr. 234 de sorbose offert, 0 gr. 289 ont disparu.

Les premiers jours, le milieu présente un rH_2 au-dessus de 2, 3, mais la disparition de la cystéine du milieu provoque une élévation du rH_2 . Dès le deuxième jour, il ne donne plus la réaction du sublimé. Dans ces deux jours, 23 gr. 1 p. 100 de sorbose offert sont consommés, tandis que, dans les quatre derniers jours de fermentation, la quantité de sorbose consommé ne s'élève qu'à 26 gr. 71 p. 100 du sorbose offert, c'est-à-dire qu'il n'y a alors qu'une consommation supplémentaire de 3 gr. 6 p. 100. Alors la fermentation s'arrête. En effet, le glucose, chose curieuse, disparaît du milieu de culture avec une vitesse beaucoup plus élevée lorsqu'il se trouve en présence du sorbose et de la cystéine surtout. On peut penser que, quoique non fermentescible, le sorbose rend le milieu plus réducteur, grâce à son rH_2 inférieur à celui du glucose. Dans ce milieu

le ferment mannitique peut se développer plus aisément et, par conséquent, peut agir sur le glucose d'une façon plus efficace.

D'ailleurs on voit se produire le même phénomène dans le cas du sucre interverti. Le ferment mannitique attaque d'abord le fructose puis le glucose, comme nous l'avons fait voir. Mais la vitesse avec laquelle la fermentation s'achève est différente. En effet, dans des milieux neutres, tandis que huit jours suffisent pour consommer 2 gr. 69 de sucre interverti, c'est-à-dire 83 gr. 6 p. 100 du sucre offert, il faut quatorze jours pour consommer 2 gr. 82 de glucose, soit 77 gr. 7 p. 100 du sucre offert (tableaux VII et XIII).

Quand on mesure le rH_2 du milieu contenant du sucre interverti, on voit qu'il réduit les mêmes matières colorantes que le fructose.

Une fermentation en présence de cystéine une fois arrêtée, peut-on la remettre en route ? Dans ce but, nous avons ajouté au milieu, dont la fermentation s'est arrêtée, 10 cmc. de peptone Chapoteau à 5 p. 100 ; le tableau ci-dessous montre les résultats obtenus :

TABLEAU XXI

DURÉE EN JOURS	SORBOSE RES- TANT EN GR. % CC. DU LIQUIDE DE CULTURE	SORBOSE CONS. EN GR. % CC. DU LIQUIDE DE CUL- TURE	SORBOSE CONS. % DU SORBOSE OFFERT	GLUCOSE RES- TANT EN GR. % CC. DU LIQUIDE DE CULTURE	GLUCOSE CONS % DU GLUCOSE OFFERT
0	1,239			1,224 + 0,293 = 1,517	
8	0,488	0,751	% 39,3	0,219	84

L'addition de cystéine et de glucose fait donc continuer la fermentation pendant quelques jours encore. Mais cette fois-ci, pour que le pourcentage du sorbose consommé par rapport au sucre offert passe de 26,71 p. 100 à 39,3 p. 100, il faut une consommation plus élevée de glucose, comme on le voit dans le tableau ci-dessus.

*
* *

Nous avons recherché le sorbitol et le mannitol dans les expériences qui précèdent.

Nous avons procédé de deux façons : par l'extraction à l'alcool et par la caractérisation à l'aide du benzaldéhyde.

400 cmc. du milieu de culture dont la teneur en sorbose fermenté était 0 gr. 75 p. 100 ont été soumis à l'extraction par l'alcool. Dans l'extract on n'a pu déceler ni l'existence du mannitol ni celle du sorbitol.

Quoique la méthode d'extraction à l'alcool n'ait pas permis la mise en évidence du mannitol aux dépens du sorbose fermenté, ce polyalcool prend, cependant, naissance au cours de la fermentation du sucre cétonique. En effet, lorsqu'on recherche le mannitol dans le milieu contenant du sorbose fermenté, par l'excellente méthode de condensation, on le trouve. Ainsi, dans la série d'expériences qui a été effectuée sans addition de peptone (tableau XXX), nous avons obtenu avec 400 cmc. de jus fermenté, 60 mgr. de tribenzalmannitol et avec le milieu peptoné (tableau XXXI), 70 mgr. de tribenzalmannitol pur fondant à 212°.

Si l'on n'arrive pas à déceler l'existence de ce polyalcool par l'extraction à l'alcool, c'est que la quantité de celui-ci est faible et que, d'autre part, une certaine quantité de sorbose se dissout dans l'alcool, ce qui

empêche la précipitation du mannitol. Néanmoins, nous avons pu apercevoir quelques petits cristaux d'une quantité indosable de mannitol dans le fond de nos cristallisoirs, à la fin de l'extraction à l'alcool.

La quantité de tribenzalmannitol obtenue selon le milieu dans lequel on a effectué l'opération. Dans l'eau pure, dans l'eau de levure fermentée ou non fermentée, on obtient des quantités différentes de tribenzalmannitol. Le pourcentage de perte de ce corps varie entre 5 et 20 p. 100.

Le tableau ci-dessous montre les résultats obtenus dans une série d'expériences effectuées avec 3 gr. p. 100 de mannitol :

MILIEUX UTILISÉS	TRIBENZALMANNITOL CORRES- PONDANT A 3 GR. DE MANNITOL	PERTES EN %
Chiffre théorique	7,27	0
Dans l'eau pure	6,9	5
Eau de levure non fermentée	6,32	13
Eau de levure fermentée. . .	5,98	21

Dans un milieu dont 100 cmc. contenaient 1 gr. 17 de sorbose, 0 gr. 69 de sorbose ont fermenté, et la quantité de tribenzalmannitol obtenue dans ce cas s'est élevée à 0 gr. 046.

Enfin, nous avons voulu voir si la cystéine ne se transforme pas au cours de la fermentation en cystine.

Pour ceci, nous avons réduit le milieu par l'hydrogène naissant, et, ensuite, nous avons cherché la cystéine. Ni la réaction au HgCl_2 , ni celle du nitroprussiate de sodium ne donnent de résultats positifs.

Il faut donc admettre que le ferment mannitique décompose intégralement la cystéine ajoutée dans le milieu.

L'ACTION DU FERMENT MANNITIQUE SUR LA DIOXYACÉTONE

Il était intéressant, enfin, de voir comment se comporterait la dioxyacétone vis-à-vis du ferment mannitique. On sait que ce sucre présente, dans sa molécule, une fonction cétonique. S'il fermentait, il devrait donner naissance à la production de glycérol.

Or, nos essais de fermentation de la dioxyacétone ont tous échoué. Ce sucre a résisté au ferment mannitique. Le milieu additionné de dioxyacétone réduit tous les colorants du tableau XXII en dix minutes. En présence de la cystéine, cette réduction se fait en cinq minutes.

Toutefois, dans un milieu contenant à la fois de la dioxyacétone et de la cystéine, la fermentation peut se déclarer.

Ainsi, nous avons préparé un milieu contenant 1 p. 100 de dioxyacétone et nous y avons ajouté 10 cmc. de cystéine $\frac{N}{200}$.

La fermentation s'arrête aussitôt après la disparition de cystéine du milieu de culture.

En deux jours de fermentation, la quantité de dioxyacétone qui a disparu correspondait à 5,84 p. 100 de la dioxyacétone ajoutée, chiffre évalué d'après la diminution du pouvoir réducteur du liquide de fermentation vis-à-vis de la liqueur cuprique.

La dioxyacétone ainsi disparue était-elle transformée en glycérol ? Nos recherches ne permettent point une réponse décisive à cette question.

Il y a évidemment production d'une substance oxydable par le brome.

Mais nous n'avons pas encore réussi à isoler le glycérol, seul moyen permettant de donner une réponse à la question que nous venons de poser.

CONCLUSIONS GÉNÉRALES

On sait que le ferment mannitique de Gayon et Dubourg ne manifeste sa spécificité mannitique que lorsqu'il se trouve en présence de fructose, seul sucre cétonique fermentescible connu jusqu'ici.

Les sucres hydrolysables contenant du fructose (sucre interverti), le glucose rendu optiquement neutre par l'influence de l'action des alcalis, peuvent donner naissance à la production de mannitol lorsqu'ils sont soumis à l'action du ferment mannitique. Dans ces cas, nous avons pu constater que le ferment s'attaque toujours avec une vitesse plus grande au fructose qu'aux autres sucres fermentescibles par ces microbes. Il y a ici une électivité très nette en faveur du sucre cétonique.

Il résulte, en outre, de nos recherches, que la réaction du milieu agit d'une façon effective sur la marche de la fermentation mannitique. Si la modification de la réaction du milieu ne supprime pas la spécificité mannitique du ferment, elle augmente la vitesse des réactions produites au cours de la fermentation et, ce qui importe, c'est que ce changement de la réaction du milieu modifie profondément le bilan de la fermentation.

Ainsi, dans le cas de sucre interverti, quand la fermentation est conduite dans un milieu qui *peut s'acidifier*, la quantité de sucre consommé dans l'unité de temps est moins élevée que dans le cas où le milieu est maintenu neutre par addition de craie.

D'autre part, le changement de la réaction du milieu

agit d'une façon effective sur la production du mannitol.

En effet, tandis que dans le milieu acide la quantité de mannitol produite ne s'élève qu'à 9, 1 p. 100 du fructose consommé, dans le milieu neutre, elle atteint 60,96 p. 100 du fructose consommé.

La même influence de la réaction du milieu se révèle dans la production de l'alcool éthylique. Dans le milieu acide, le ferment ne produit que de faibles quantités d'alcool (19 mgr. pour 0 gr. 87 de sucre interverti consommé), alors que dans le milieu maintenu neutre la production de l'alcool est assez élevée (165 mgr. pour 3 gr. 115 de sucre consommé).

Enfin, la production de l'acidité augmente, fait qu'on observe, du reste, dans toute fermentation « acidogène » où la craie présente neutralise les acides au fur et à mesure de leur production.

Dans le cas où l'alimentation glucidique est représentée par le glucose seul, le changement de la réaction du milieu se montre également comme un facteur déterminant de la spécificité du ferment. Ici, en milieu acide, le ferment se révèle comme un ferment « acidogène » et faiblement alcoogène.

Les acides produits dans le milieu acide sont l'acide lactique et l'acide acétique, et c'est ce dernier acide qui prédomine. Mais, dans le milieu neutre, c'est-à-dire dans le milieu en présence de la craie, c'est l'acide lactique qui devient le principal acide produit.

En outre, le ferment mannitique agit sur le glucose, en milieu neutre, comme producteur d'alcool éthylique, alors qu'en milieu acide, ce même ferment ne produit que des traces d'alcool aux dépens du glucose. Ainsi, le ferment de Gayon et Dubourg qui, en milieu glucosé acide, agit comme producteur d'acide acétique, en milieu neutre se montre producteur d'acide lactique et, ce

qui est particulièrement frappant, producteur d'alcool.

Comme on l'a déjà indiqué, le ferment de Gayon et Dubourg n'est ferment mannitique qu'en présence de fructose. Cette spécificité mannitique n'est aucunement fonction de la réaction du milieu. Le changement de réaction du milieu n'influe que sur ses propriétés « acidogènes ». En effet, en milieu acide, en présence de fructose, le ferment de Gayon et Dubourg donne naissance à la production d'acide lactique et d'acide acétique, tout comme dans le cas du glucose. Mais, dans le cas du fructose, la répartition de ces deux acides est tout à fait différente : c'est l'acide lactique qui l'emporte de loin sur l'acide acétique. Toutefois, lorsqu'on entrave l'acidification du milieu par addition de craie, le sens de la réaction biochimique du ferment est renversé. En fait, dans ce cas, ce sont les quantités d'acide acétique qui sont supérieures à celles de l'acide lactique produit.

La spécificité mannitique du ferment de Gayon et Dubourg semble être due à deux facteurs :

La fonction cétonique du glucide.

La réductibilité très élevée du milieu de culture, telle qu'elle peut être déterminée par voie colorimétrique suivant les méthodes de détermination du rH_2 .

Ainsi, le sorbose, sucre cétonique, devrait donner naissance à la production de son alcool correspondant le sorbitol, si la fonction cétonique seule était suffisante pour permettre la fixation de l'hydrogène sur la molécule. Mais ce n'est nullement le cas, comme cela résulte de nos expériences. Pour que ce sucre cétonique puisse être hydrogéné, il faut encore que le milieu dans lequel il se trouve montre une tension d'hydrogène suffisante. Mais, chose remarquable, lorsque cette condition est remplie, par exemple, lorsque le milieu de culture est additionné de sorbose, qui est entraîné en fermentation

par la présence de glucose, c'est le mannitol qui prend naissance et *non pas le sorbitol*. Sans doute, on devrait penser que le mannitol, dans ce cas, aurait pu prendre naissance aux dépens du glucose qui fermente en même temps que le sucre cétonique. Pour lever tout doute à ce sujet, une expérience spéciale a été effectuée, qui a montré que le *glucose seul*, en présence de cystéine, ne donne nullement lieu à la production du mannitol.

Donc, en résumé, ce qui caractérise la spécificité mannitique du ferment de Gayon et Dubourg, c'est son aptitude à capter l'hydrogène mobile produit pendant le premier stade de la dégradation du fructose et à transporter cet hydrogène sur la fonction cétonique de ce sucre. C'est là où il faut chercher la cause de la tension d'hydrogène extrêmement élevée de la solution de fructose.

Notons enfin que ni le lactose, ni le maltose, ni le saccharose et ni le lactose hydrolysé ne donnent lieu à la production de mannitol.

DEUXIÈME THÈSE

PROPOSITIONS DONNÉES PAR LA FACULTÉ :

LES POTENTIELS D'OXYDO-RÉDUCTION

VU ET APPROUVÉ :

Paris, le 10 Février 1936.

*Pour le Doyen de la Faculté des Sciences,
l'Assesseur :*

J. PERRIN.

VU ET PERMIS D'IMPRIMER :

Le Recteur de l'Académie de Paris :

S. CHARLÉTY.

TABLE DES MATIÈRES

PREMIÈRE PARTIE

1° LA FERMENTATION MANNITIQUE DANS LES MALADIES DU VIN..	7
2° L'ISOLEMENT DU FERMENT MANNITIQUE PAR GAYON ET DUBOURG ET LES TRAVAUX ULTÉRIEURS	13
3° LA FERMENTATION MANNITIQUE COMME SPÉCIFICITÉ BIOCHI- MIQUE PARTICULIÈRE ET SA PLACE PARMI LES AUTRES TYPES DE FERMENTATION	20

DEUXIÈME PARTIE

1° CARACTÈRES GÉNÉRAUX DU FERMENT DE GAYON ET DUBOURG..	29
2° MÉTHODES ANALYTIQUES EMPLOYÉES	30
a) Préparation des milieux de culture	30
b) La préparation du sucre interverti	30
c) Stérilisation	31
3° LES MÉTHODES DE DOSAGE EMPLOYÉES	31
a) Dosage du sucre et défécation des milieux	31
b) Dosage des sucres aldéhydiques	34
c) Dosage de l'alcool	35
d) Extraction et dosage du mannitol	37
e) Caractérisation et dosage de l'acide acétique et des acides lactique et pyruvique	41

TROISIÈME PARTIE

L'ACTION DU FERMENT MANNITIQUE SUR LES SUCRES FERMENTESCIBLES

1° L'ACTION DU FERMENT MANNITIQUE SUR LE SUCRE INTERVERTI	42
a) La marche de la fermentation en milieu acide.	42
b) La marche de la fermentation dans le milieu maintenu neutre	46
2° L'ACTION DU FERMENT MANNITIQUE SUR LE GLUCOSE.	52
a) La marche de la fermentation en milieu acide.	52
b) La marche de la fermentation dans le milieu maintenu neutre	54

3° L'ACTION DU FERMENT MANNITIQUE SUR LE FRUCTOSE SEUL. .	56
a) La marche de la fermentation en milieu acide.	56
b) La marche de la fermentation dans le milieu maintenu neutre	59
4° L'ACTION DU FERMENT MANNITIQUE SUR QUELQUES DIHOLOSIDES	61

QUATRIÈME PARTIE

LA FERMENTATION MANNITIQUE ET LA RÉDUCTIBILITÉ DES MILIEUX

ESSAIS EN VUE DE DIMINUER LE RH_2 DU MILIEU DE CULTURE. . .	66
1° Modification du pH	66
2° Hydrosulfite de sodium.	67
3° Mousse de platine	67
4° Sulfite de calcium	69
ESSAIS DE FERMENTATIONS DU SORBOSE	70
1° Fermentation du sorbose seul	70
2° Fermentation simultanée du sorbose et du glucose.	72
3° Fermentation du sorbose en présence de cystéine.	78
L'ACTION DU FERMENT MANNITIQUE SUR LA DIOXYACÉTONE. . .	84
CONCLUSIONS GÉNÉRALES	86
DEUXIÈME THÈSE	90
